

ARMANDO BERGAMIN FILHO

ENGENHEIRO AGRÔNOMO, MESTRE EM FITOPATOLOGIA
PROFESSOR ASSISTENTE DO DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CARACTERIZAÇÃO DE UM BACTERÍÓFAGO ATIVO CONTRA
Xanthomonas campestris (PAMMEL) DOWSON
E
Xanthomonas vesicatoria (DOIDGE) DOWSON
E SEU EMPREGO NO CONTROLE DESSES PATÓGENOS

Orientador : HIROSHI KIMATI

Tese de Doutorado apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
da Universidade de São Paulo

PIRACICABA
1975

À

Nicole

A G R A D E C I M E N T O S

O autor expressa seus agradecimentos:

Ao Professor Dr. HIROSHI KIMATI pela valiosa colaboração como orientador deste trabalho e pela revisão dos originais;

Ao Professor Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO, seu mestre, pelo estímulo constante e valiosas sugestões;

Ao Professor Dr. DARCY MARTINS DA SILVA e ao Engº Agrº JOSÉ CARLOS MATYIS pelas fotomicrografias eletrônicas;

Ao Professor Dr. FERDINANDO GALLI pelas facilidades e oportunidades concedidas e pela revisão dos originais;

Ao Professor Dr. CAIO OCTÁVIO NOGUEIRA CARDOSO pelas fotografias;

Ao Engº Agrº LÉO PIRES FERREIRA, ao Engº Agrº FUJIO AKIBA e ao Dr. TAKAO NAMEKATA pelas linhagens bacterianas fornecidas;

Ao Professor Dr. CLÉLIO LIMA SALGADO pelo auxílio na análise estatística;

Ao Professor Emérito Dr. CLYDE CLARENCE ALLISON pela versão, para o inglês, do Resumo;

Ao funcionário SAMUEL MARTINS pelo valioso auxílio;

À acadêmica NICOLE BAUDON pelo estímulo constante.

ÍNDICE

	Página
DEDICATÓRIA	ii
AGRADECIMENTOS	iii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. ESPECIFICIDADE	3
2.1.1. Os fagos são específicos	3
2.1.2. Os fagos não são específicos	6
2.2. DETECÇÃO DE PATÓGENOS EM SEMENTES	7
2.3. CONTROLE DE DOENÇAS ATRAVÉS DE FAGOS	8
3. MATERIAL	12
3.1. ESPÉCIES E LINHAGENS BACTERIANAS	12
3.2. VARIEDADES DE REPOLHO E PIMENTÃO	15
4. MÉTODOS	16
4.1. ISOLAMENTO E DETECÇÃO DO FAGO	16
4.1.1. Isolamento	16
4.1.1.1. Solo	16
4.1.1.2. Semente	17
4.1.1.3. Tecido vegetal doente	17
4.1.2. Detecção	18
4.1.2.1. Teste quantitativo	18
4.1.2.2. Teste qualitativo	18
4.2. PREPARAÇÃO DE ESTOQUE DE FAGO COM ALTO TÍTULO	19
4.3. CARACTERÍSTICAS GERAIS DO FAGO	20
4.3.1. Morfologia da placa de lise	20
4.3.2. Especificidade	20
4.3.3. Inativação térmica	20
4.3.4. Inativação com ultravioleta e fotorreativação	21
4.3.5. Adsorção	22
4.3.6. Curvas de crescimento	22
4.3.7. Lisogenia	23
4.3.8. Morfologia da partícula	25

4.4	DETECÇÃO DE <u>XANTHOMONAS CAMPESTRIS</u> EM SEMENTES DE REPOLHO ATRAVÉS DE FAGOS	25
4.4.1.	Determinação do tamanho da amostra	26
4.4.2	Determinação do tempo de incubação	27
4.4.3	Determinação do efeito de uma pequena amostra associada a um longo período de incubação	28
4.5	CONTROLE DAS DOENÇAS CAUSADAS POR <u>XANTHOMONAS CAMPES-TRIS</u> EM REPOLHO E <u>XANTHOMONAS VESICATORIA</u> EM PIMENTÃO ATRAVÉS DO FAGO	28
5.	RESULTADOS	30
5.1.	ISOLAMENTO E DETECÇÃO DO FAGO	30
5.2.	PREPARAÇÃO DE ESTOQUE DE FAGO COM ALTO TÍTULO	30
5.3.	CARACTERÍSTICAS GERAIS DO FAGO	31
5.3.1.	Morfologia da placa de lise	31
5.3.2.	Especificidade	32
5.3.3.	Inativação térmica	33
5.3.4.	Inativação com ultravioleta e fotorreativação	35
5.3.5.	Adsorção	35
5.3.6.	Curvas de crescimento	35
5.3.7.	Lisogenia	41
5.3.8.	Morfologia da partícula	41
5.4	DETECÇÃO DE <u>XANTHOMONAS CAMPESTRIS</u> EM SEMENTES DE REPOLHO ATRAVÉS DE FAGOS	43
5.4.1.	Determinação do tamanho da amostra	43
5.4.2	Determinação do tempo de incubação	44
5.4.3	Determinação do efeito de uma pequena amostra associada a um longo período de incubação	45
5.5.	CONTROLE DAS DOENÇAS CAUSADAS POR <u>XANTHOMONAS CAMPES-TRIS</u> EM REPOLHO E <u>XANTHOMONAS VESICATORIA</u> EM PIMENTÃO ATRAVÉS DO FAGO	45
6.	DISCUSSÃO	48
6.1.	ISOLAMENTO E DETECÇÃO DO FAGO	48
6.1.1.	Os métodos de purificação e a técnica do enriquecimento	48
6.1.2.	Plantas perenes, plantas anuais e o isolamento de fagos	49
6.2.	PREPARAÇÃO DE ESTOQUE DE FAGOS COM ALTO TÍTULO	55
6.3.	CARACTERÍSTICAS GERAIS DO FAGO	55

6.3.1. Morfologia da placa de lise	55
6.3.2. Especificidade	57
6.3.2.1. Métodos de avaliação	58
6.3.2.2. Aspectos gerais do problema	58
6.3.2.3. A especificidade do fago isolado de <u>Xanthomonas campestris</u>	62
6.3.3. Inativação térmica	64
6.3.4. Inativação com ultravioleta e fotorreativação	66
6.3.5. Adsorção	68
6.3.6. Curvas de crescimento	69
6.3.7. Lisogenia	70
6.3.8. Morfologia da partícula	72
6.4. DETECÇÃO DE <u>XANTHOMONAS CAMPESTRIS</u> EM SEMENTES DE REPOLHO ATRAVÉS DE FAGOS	74
6.5. CONTROLE DAS DOENÇAS CAUSADAS POR <u>XANTHOMONAS CAMPESTRIS</u> EM REPOLHO E <u>XANTHOMONAS VESICATORIA</u> EM PIMENTÃO ATRAVÉS DO FAGO	76
6.5.1. Modo de ação do fago no controle de <u>Xanthomonas campestris</u> e <u>Xanthomonas vesicatoria</u>	76
6.5.2. As características de crescimento do fago e a eficiência do controle	77
6.5.3. Linhagens bacterianas resistentes aos fagos e a eficácia do controle	78
7. CONCLUSÕES	81
7.1. SOBRE O ISOLAMENTO E DETECÇÃO DO FAGO	81
7.2. SOBRE A OBTENÇÃO DE ESTOQUE DE FAGO COM ALTO TÍTULO	81
7.3. SOBRE AS CARACTERÍSTICAS GERAIS DO FAGO.	81
7.4. SOBRE A DETECÇÃO DE <u>XANTHOMONAS CAMPESTRIS</u> EM SEMENTES DE REPOLHO ATRAVÉS DO FAGO	82
7.5. SOBRE O CONTROLE DAS DOENÇAS CAUSADAS POR <u>XANTHOMONAS CAMPESTRIS</u> EM REPOLHO E <u>XANTHOMONAS VESICATORIA</u> EM PIMENTÃO ATRAVÉS DO FAGO	82
8. RESUMO	84
9. SUMMARY	85
10. LITERATURA CITADA	86
APÊNDICE	101

1. INTRODUÇÃO

Desde o primeiro trabalho de COONS e KOTILA (1925), com bacteriófagos de uma espécie fitopatogênica, até as mais recentes pesquisas sobre controle de doenças (CIVEROLO, 1973), sobre ecologia (DOWLER e WEAVER, 1975) e sobre patologia de sementes (KAUFFMAN e REDDY, 1975), todas envolvendo bactérias fitopatogênicas e seus fagos, muito se fez dentro desse ramo da Patologia Vegetal. No Brasil, no entanto, não há trabalho algum que trate especificamente de fagos de bactérias fitopatogênicas. Apenas NAMEKATA (1971), num trabalho com Xanthomonas citri, utilizou bacteriófagos mas, mesmo neste caso, os bacteriófagos foram importados do Japão e aqui se procedeu somente a testes de sensibilidade com vários isolados da bactéria.

Em vista disso, é de muito interesse que pesquisas envolvendo bacteriófagos sejam feitas entre nós pois as perspectivas, conforme se depreende da vasta literatura existente sobre o assunto, são encorajadoras. Dentre os vários campos da Fitopatologia nos quais os fagos podem ser empregados com sucesso destacam-se, pela grande atualidade, a patologia de sementes e o controle de doenças bacterianas.

Os métodos tradicionais de detecção de bactérias em sementes (TEMPE, 1970), além de consumirem tempo e trabalho excessivos, nem sempre dão resultados concretos. A técnica desenvolvida por KATZNELSON (1950) e KATZNELSON e SUTTON (1951), com o emprego de fagos, representou um grande avanço na patologia de sementes, já que resultados altamente confiáveis podem ser obtidos em cerca de 24 a 48 horas (WALLEN e SUTTON, 1965). Um dos objetivos do presente trabalho é adaptar essa técnica à Podridão Negra das Crucíferas pois, como se sabe, o agente causal da doença, Xanthomonas campestris, é disseminado de região para região, principalmente, através de sementes infectadas (WALKER, 1969).

Talvez mais importante que a técnica de detecção de bactérias em sementes seja o controle de doenças através de fagos, que se constitui no outro objetivo principal desta pesquisa. É reconhecido por todos ser a polui-

ção, hoje, um dos maiores problemas da humanidade. Das várias formas existentes de poluição cada vez ganha maior importância aquela representada pelo uso intensivo de defensivos agrícolas tais como inseticidas, fungicidas e bactericidas. Dentre os muitos danos que estes produtos causam à natureza está o sempre prejudicial desequilíbrio biológico pois tais produtos são inespecíficos combatendo, além do agente patogênico, os microrganismos benéficos que compartilham do mesmo "habitat". O emprego de bacteriófagos no controle de doenças vegetais não apresenta esse grave inconveniente eis que eles só eliminam o patógeno em virtude de sua, quase sempre, alta especificidade. Assim, é de se esperar que, por este e por outros motivos, como a não toxidez do fago ao homem, animais e plantas, o uso de bacteriófagos no controle de doenças merecerá dos pesquisadores, em futuro não muito distante, uma atenção maior da que lhe é dada atualmente. Concorde com essas idéias está COSTA (1975) o qual, textualmente, afirma que "esse método de controle não vem sendo investigado como o devia ser, pois oferece bastante possibilidade de êxito". Mais adiante, discutindo a conveniência do emprego de fagos no controle, o mesmo autor apresenta uma interessante vantagem de seu uso, que vem juntar-se às já alistadas anteriormente, qual seja a de que "formas resistentes (da bactéria) que se desenvolvessem por pressão de seleção seriam também contrabalançadas pelo desenvolvimento de mutantes do vírus mais agressivos a essas novas formas, pois (o vírus) é também capaz de ser modificado por seleção."

Ao lado de ensaios sobre esses 2 temas envolvendo bacteriófagos, sanidade de sementes e controle, objetivos principais desta pesquisa, procedeu-se também à caracterização do fago isolado de Xanthomonas campestris, conforme preconizado por KLEMENT e LOVAS (1959) os quais enfatizam a necessidade de se dar uma descrição exata dos novos fagos descobertos a fim de se evitar confusão no futuro.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ESPECIFICIDADE

A existência ou não de fagos específicos para uma determinada espécie bacteriana é um fato que tem provocado inúmeros debates (OKABE e GOTO, 1963). As opiniões, nem sempre baseadas em pesquisas realmente cuidadosas, variam desde a negação completa de tal especificidade (STOLP, 1961; STOLP e STARR, 1964) até a afirmação veemente de que ela existe (EISENSTARK e BERNSTEIN, 1966; KLEMENT, 1959; HAYWARD, 1964; TAYLOR, 1970), passando por aqueles que garantem sua existência apenas para as espécies do gênero Xanthomonas, negando-a às espécies do gênero Pseudomonas (KLEMENT e LOVREKOVICH, 1961; KIRÁLY, KLEMENT, SOLYMOSY e VOROS, 1974).

O grande número de trabalhos publicados a respeito da especificidade de fagos a espécies bacterianas é decorrência da grande importância prática que esse fato apresenta. Assim é que, para a maioria das técnicas que envolvem fagos no campo da Fitopatologia, a especificidade é um requisito fundamental (OKABE e GOTO, 1963). A identificação rápida de espécies bacterianas, por meio de fagos, requer uma alta especificidade (THOMAS, 1943 e 1947; THORNBERRY, BRAUN e ELROD, 1949; TAYLOR, 1970), o mesmo ocorrendo com a técnica de detecção de patógenos, por intermédio de fagos, no interior de sementes (KATZNELSON, 1950; KATZNELSON e SUTTON, 1951; TEMPE, 1970) e, em menor escala, com o controle de doenças bacterianas através de bacteriófagos (FULTON, 1950; CIVEROLO, 1970 e 1973).

2.1.1. Os fagos são específicos

Um dos primeiros pesquisadores que percebeu a possibilidade do uso de bacteriófagos, como um substituto das complicadas, demoradas e incertas reações bioquímicas, para a identificação de espécies bacterianas foi THOMAS

(1943 e 1947), se bem que uma prova cabal da especificidade dos fagos só tenha sido conseguida pouco mais tarde pelo grupo de H.H. THORNBERRY (THORNBERRY, EISENSTARK e ANDERSON, 1948; THORNBERRY, BRAUN e ELROD, 1949). Neste último trabalho, os autores testaram 62 linhagens de 22 espécies diferentes de Xanthomonas frente a um fago isolado de Xanthomonas pruni. Apenas as 6 linhagens de Xanthomonas pruni, dentre as 62 testadas, foram lisadas pelo bacteriófago.

Esses resultados provocaram uma corrida dos pesquisadores em direção a trabalhos semelhantes, já que as perspectivas, conforme frisaram THORNBERRY, BRAUN e ELROD (1949), eram bastante promissoras. E, já no ano seguinte, KATZNELSON (1950) publicou uma nova técnica de detecção de patógenos no interior de sementes cujo requisito essencial é a especificidade. Essa linha de pesquisa foi levada adiante através dos anos e continua atual até hoje, como será visto no item 2.2.

Outro trabalho, do mesmo porte daquele de THORNBERRY, BRAUN e ELROD (1949), porém mais completo, já que maior número de linhagens e espécies bacterianas foram testadas, foi realizado por EISENSTARK e BERNSTEIN (1955). Das 212 linhagens de 53 espécies bacterianas testadas por esses autores frente a 8 fagos isolados de Xanthomonas pruni, só foram lisadas as 12 linhagens pertencentes a essa espécie, mostrando o alto grau de especificidade dos fagos empregados.

A resultados semelhantes chegaram CONN, BOTTCHE e RANDALL (1945) com fagos de Agrobacterium radiobacter e de outras bactérias do solo, SUTTON e KATZNELSON (1953) com fagos de Pseudomonas pisi, Pseudomonas atrofaciens, Pseudomonas coronafaciens e Xanthomonas translucens, JAMES e ROSLYCKY (1956) com fagos de Xanthomonas trifolii, KLEMENT (1957) com fago de Xanthomonas phaseoli f. fuscans, CROSSE, BENNETT e GARRETT (1958) com fagos de Erwinia amylovora, KLEMENT (1959) com fagos de Xanthomonas carotae e Xanthomonas vesicatoria, KLEMENT e LOVAS (1959) com fago de Corynebacterium

flaccumfaciens, COOK e KATZNELSON (1960) com fago de Corynebacterium insidiosum, PERLASCA (1960) com fago de Pseudomonas syringae, CROSSE e GARRETT (1961) com fagos de Pseudomonas morsprunorum e Pseudomonas syringae, MAGIE e WILSON (1962) com fago de Erwinia nigrifluens, WILSON e MAGIE (1962) com fago de Pseudomonas savastanoi, BALDWIN JR. e GOODMAN (1963) com fago de Erwinia amylovora, BILLING (1963) com fagos de Pseudomonas spp, CROSSE e GARRETT (1963) com fagos de Pseudomonas morsprunorum e Pseudomonas syringae, HAYWARD (1964) com fagos de Xanthomonas malvacearum, NEAL JR., ENNS e GOODMAN (1964) com fagos de Erwinia amylovora, LOVREKOVICH e KLEMENT (1965) com fagos de Xanthomonas vesicatoria, CROSSE e GARRETT (1966) com fago de Pseudomonas morsprunorum e SUTTON (1966) com fago de Pseudomonas atrofaciens.

Essa linha de pesquisa tem continuado e resultados recentes confirmam a existência de várias associações altamente específicas entre um determinado fago e uma determinada espécie bacteriana, como bem o demonstram os resultados de BILLING (1970) com fagos de Pseudomonas syringae e Pseudomonas phaseolicola, CROSSE e GARRETT (1970) com fagos de Pseudomonas morsprunorum, SINGH, RAO e VERMA (1970) com fago de Xanthomonas malvacearum, STANIEWSKI (1970) com fagos de várias espécies de Rhizobium, TAYLOR (1970) com fagos de Pseudomonas phaseolicola, TAYLOR (1972) com fagos de Pseudomonas pisi, ECHANDI e SUN (1973) com fago de Corynebacterium michiganense e GARRETT, CROSSE e SLETTEN (1974) com fagos de Pseudomonas morsprunorum.

Um fato de grande significado, e que deve ser realçado aqui, é que, em todos esses casos citados anteriormente, o bacteriófago foi sempre isolado de locais onde a bactéria, à qual ele se mostrou virulento, estava presente, como plantas infectadas, solo sob a planta hospedeira da bactéria ou sementes contaminadas internamente.

2.1.2. Os fagos não são específicos

Não obstante o número de trabalhos mostrando a polivalência dos bacteriófagos ser reduzido, estão entre eles o mais antigo (COONS e KOTILA, 1925) e os mais detalhados e exaustivos (STOLP, 1961; STOLP e STARR, 1964).

No trabalho de COONS e KOTILA (1925) o fago foi isolado de cenouras em decomposição, solo e água de rio mostrando-se ativo frente a Bacillus carotovorus (Erwinia carotovora), Bacillus atrosepticus (Erwinia atroseptica) e Bacterium tumefaciens (Agrobacterium tumefaciens). A não especificidade dos bacteriófagos também ficou evidenciada em trabalho de SUTTON, KATZNELSON e QUADLING (1958) no qual um fago, isolado de adubo orgânico, mostrou-se ativo contra 40 linhagens de 13 espécies de Xanthomonas de um total de 52 linhagens de 25 espécies testadas.

As controvérsias sobre a especificidade ou não dos bacteriófagos levaram 2 pesquisadores de renome, H. STOLP e M.P. STARR, a fazerem as mais exaustivas pesquisas já feitas sobre o assunto. Assim, STOLP (1961) testou 200 linhagens de Pseudomonas fluorescens e 150 espécies de Pseudomonas fitopatogênicas frente a 65 diferentes fagos, todos eles isolados do solo. Concluiu, categoricamente, que os fagos empregados eram polivalentes. Pouco mais tarde, trabalho semelhante foi feito, usando-se agora espécies do gênero Xanthomonas (STOLP e STARR, 1964). Foram testadas 500 linhagens de 80 espécies diferentes frente a 12 fagos que, a exemplo do trabalho anterior, foram isolados do solo. Também aqui, os resultados mostraram serem os fagos não específicos. E, tão convencidos da polivalência dos bacteriófagos ficaram esses autores que, em revisão publicada no ano seguinte no "Annual Review of Phytopathology" (STOLP, STARR e BAIGENT, 1965), ignorando todos os trabalhos anteriores que mostravam o contrário, concluíram ser impossível identificar bactérias com o uso de bacteriófagos.

A resultados semelhantes, quanto à polivalência dos bacteriófagos, che-

garam BRUCH e ALLEN (1957) e PARKER e ALLEN (1957) com fagos de Rhizobium meliloti, ROSLYCKY, ALLEN e McCOY (1962) com fagos de Agrobacterium radiobacter, HENDRY, CARPENTER e GARRARD (1967) com fagos de Erwinia amylovora, SUTTON e WALLEN (1967) com fagos de Xanthomonas phaseoli, tendo sido os fagos, em todos os trabalhos, isolados do solo.

2.2. DETECÇÃO DE PATÓGENOS EM SEMENTES

A patologia de sementes, de enorme importância prática (TEMPE e CROSIER, 1959), tem-se desenvolvido aceleradamente nos últimos anos (LIMONARD, 1967; LANDAETA, 1968; THOMSON, 1969; TEMPE, 1970; NEERGAARD, 1972). Mesmo assim, a detecção de bactérias fitopatogênicas que se encontram no interior de sementes, através das técnicas tradicionais (LANDAETA, 1968; TEMPE, 1970), é uma tarefa trabalhosa, demorada e que nem sempre apresenta resultados conclusivos (KATZNELSON, 1950; GOTO, 1972a).

A técnica descrita por KATZNELSON (1950) e KATZNELSON e SUTTON (1951), a respeito da rápida detecção de patógenos no interior de sementes por intermédio de bacteriófagos, veio facilitar sensivelmente o trabalho dos patologistas de sementes, já que resultados conclusivos podem ser conseguidos em poucas horas. A técnica é simples, como poderá ser constatado no item 4.4, e tem como princípio a alta capacidade de replicação dos fagos quando em presença de sua hospedeira específica. Aliás, a especificidade do bacteriófago, como já discutido anteriormente, é de capital importância para que o método possa ser aplicado (OKABE e GOTO, 1963; TEMPE, 1970; KIRÁLY, KLEMENT, SOLYMOSSY e VOROS, 1974).

Além das espécies Pseudomonas phaseolicola e Xanthomonas phaseoli, que foram empregadas nos trabalhos iniciais de detecção de patógenos em sementes pelo uso de fagos (KATZNELSON, 1950; KATZNELSON e SUTTON, 1951; KATZNEL

SON, SUTTON e BAYLEY, 1954), também Xanthomonas translucens f. undulosa (KATZNELSON e SUTTON, 1953), Pseudomonas pisi (SUTTON e KATZNELSON, 1953), Corynebacterium flaccumfaciens (KLEMENT, 1957; KLEMENT e LOVAS, 1959), Xanthomonas phaseoli f. fuscans (KLEMENT, 1957; WALLEN e SUTTON, 1965), Corynebacterium insidiosum (COOK e KATZNELSON, 1960), Corynebacterium michiganense (ECHANDI e SUN, 1973) e Xanthomonas oryzae (KAUFFMAN e REDDY, 1975) foram passíveis de detecção por esse método.

2.3. CONTROLE DE DOENÇAS ATRAVÉS DE FAGOS

Desde que os bacteriófagos foram descobertos por TWORT e D'HERELLE, na década de 1910, pensou-se em empregá-los no controle de doenças causadas por bactérias. Essa tentativa deu-se primeiro na Patologia Animal para, logo em seguida, também estender-se à Patologia Vegetal. Mas as grandes esperanças que foram depositadas nesses novos agentes de cura logo se desvaneceram, eis que resultados pouco animadores foram conseguidos pelos primeiros pesquisadores (SALLE, 1961).

Esse insucesso inicial, no entanto, não impediu que pesquisas nesse campo continuassem sendo feitas. Especificamente em Fitopatologia, além do grande número de trabalhos e revisões publicados no passado (STOLP, 1956; CIVEROLO, 1972), há, atualmente, como que um ressurgimento de pesquisas nessa área.

Trabalhos antigos que tratam do assunto, já revisados exhaustivamente por outros autores (OKABE e GOTO, 1963; CIVEROLO, 1972), incluem um número praticamente idêntico de resultados positivos e negativos conseguidos no controle de moléstias bacterianas por meio de bacteriófagos. Entre os primeiros estão os de COONS e KOTILA (1925) que trabalharam com espécies do gênero Erwinia, MUNCIE e PATEL (1930) com Agrobacterium tumefaciens e THOMAS

(1935) com Xanthomonas stewartii. No grupo que não conseguiu resultados positivos estão BROWN e QUIRK (1929) e KENT (1937) que trabalharam com Agrobacterium tumefaciens.

Pertencem ainda a esse período inicial os trabalhos que tentaram elucidar o papel, na natureza, dos fagos que atacam espécies de Rhizobium. Sobre esse assunto há aqueles que acreditam estar a baixa produtividade de leguminosas, em determinados solos, relacionada com um maior número de fagos que causam lise em espécies de Rhizobium (DEMOLON e DUNEZ, 1932 e 1935; VAN DECAVEYE e KATZNELSON, 1936; KATZNELSON e WILSON, 1941) no que são frontalmente combatidos por KLECZKOWSKA (1945b e 1957) que não encontrou nenhuma evidência que comprove tal afirmativa.

O início de uma nova fase, mais quantitativa, no controle de doenças por meio de fagos deu-se com a pesquisa de FULTON (1950) que trabalhou com a queima bacteriana do fumo, causada por Pseudomonas tabaci, e com 2 fagos isolados dessa bactéria. Esse autor conseguiu, em casa de vegetação, inoculando "seedlings" de fumo com os fagos, uma hora antes da inoculação da bactéria, reduções da ordem de 82% para o fago 1, 49% para o fago 2 e 83% quando ambos os fagos foram inoculados juntos.

Esse trabalho de FULTON (1950) abriu caminho para uma série de outros semelhantes, todos eles com bases quantitativas, envolvendo Xanthomonas pruni (KEIL e WILSON, 1963; CIVEROLO e KEIL, 1969; CIVEROLO, 1970 e 1973), Agrobacterium tumefaciens (BOYD, HILDEBRANDT e ALLEN, 1971) e Xanthomonas oryzae (KUO, CHANG, YANG e YANG, 1971).

Com relação a Xanthomonas pruni, os trabalhos mais recentes de CIVEROLO e KEIL (1969) e CIVEROLO (1970 e 1973) vieram confirmar os resultados iniciais obtidos por KEIL e WILSON (1963). As maiores reduções na porcentagem de doença conseguidas nessa série de pesquisas foram da ordem de 97% quando o fago e a bactéria foram inoculados, em "seedlings" de pêsego, ao

mesmo tempo e de 71% quando o fago foi inoculado uma hora antes da bactéria. Outro fato interessante que esses trabalhos mostram é que o fago, quando aplicado após a planta ter sido inoculada com a bactéria, apresenta pouco ou nenhum efeito, isso indicando não ter ele ação terapêutica.

Resultados também positivos conseguiram BOYD, HILDEBRANDT e ALLEN (1971) trabalhando com Agrobacterium tumefaciens. Esses autores mediram a redução em peso e em diâmetro de galhas causada pela bactéria em tomateiro quando um fago específico para o patógeno era inoculado. As porcentagens de redução encontradas foram de 72 e 57, respectivamente, para peso e diâmetro de galhas.

A resultados ainda mais animadores chegaram KUO, CHANG, YANG e YANG (1971) que conduziram suas pesquisas, em arroz, com Xanthomonas oryzae e um fago isolado dessa bactéria. Tomando-se como referência a inoculação do patógeno, foram feitos 5 tratamentos, quanto à época de inoculação, com o fago: 1 dia antes, 3 dias antes, 7 dias antes, ao mesmo tempo e 1 dia depois. As porcentagens de redução da doença foram, respectivamente, 100, 96, 86, 13 e 24. Também aqui ficou mostrado, claramente, o modo de ação do fago: muito mais protetor que curativo.

Além desses trabalhos todos nos quais resultados positivos quanto ao controle de fitobacterioses por fagos foram conseguidos, a literatura registra também experiências das quais não se puderam tirar conclusões definitivas. Entre estas estão as de GOODMAN (1965), HENDRY, CARPENTER e GARRARD (1967) e ZEITOUN e WILSON (1969) todas realizadas com espécies do gênero Erwinia.

Finalmente, analisando o papel dos fagos na natureza destacam-se os trabalhos, bastante especulativos, de MASSEY (1934), VIDAVER e SCHUSTER (1969) e ERSKINE (1973). O primeiro, constatando o fato de ser menor a incidência de Xanthomonas malvacearum em algodão nos locais inundados periodicamen

te pelo Rio Nilo, concluiu serem os fagos os responsáveis pois, do rio, eles foram isolados em grande número. VIDAVER e SCHUSTER (1969), estudando a causa de as doenças causadas em feijão por Pseudomonas phaseolicola e Pseudomonas syringae serem mais prevalentes abaixo de 22°C, também concluíram que os fagos estavam envolvidos no fato. Esses autores descobriram que diversos fagos de Xanthomonas phaseoli, muito comuns em plantações de feijão, são ativos contra Pseudomonas phaseolicola e Pseudomonas syringae em temperaturas acima de 24°C, o que impediria que os 2 patógenos se tornassem problema grave sob altas temperaturas. Já ERSKINE (1973) postula, em seu trabalho com pereira e Erwinia amylovora, visando conseguir um melhor controle, a veiculação do fago junto com uma bactéria que não cause danos à planta hospedeira. Isso é conseguido através de uma associação lisogênica fago-bactéria e tem a vantagem, segundo o autor, de conferir ao fago características sistêmicas.

3. MATERIAL

3.1. ESPÉCIES E LINHAGENS BACTERIANAS

As espécies e linhagens utilizadas neste trabalho encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Caracterização das linhagens bacterianas

Espécies	Linhagem	Origem da Cultura *	Hospedeiro
<i>Xanthomonas albilineans</i>	XA1	ESALQ	Saccharum sp
<i>Xanthomonas campestris</i>	XC1	ENA (827)	Brassica oleracea var. acephala
	XC2	ENA (2110)	Brassica oleracea var. acephala
	XC3	ESALQ	Brassica oleracea var. acephala
	XC4	ESALQ	Brassica oleracea var. capitata
	XC5	ESALQ	Brassica oleracea var. capitata
	XC6	ESALQ	Brassica oleracea var. capitata
<i>Xanthomonas citri</i>	XCi1	IB (6802)	Citrus sp
	XCi2	IB (6804)	Citrus sp
	XCi3	IB (6911)	Citrus sp
	XCi4	IB (6924)	Citrus sp
	XCi5	IB (7006)	Citrus sp
<i>Xanthomonas malvacearum</i>	XM11	ESALQ	Gossypium sp
	XM12	ESALQ	Gossypium sp

(continua)

(continuação)

Espécies	Linhagem	Origem da Cultura *	Hospedeiro
<i>Xanthomonas manihoti</i>	XM1	ENA (300)	<i>Manihot utilissima</i>
	XM2	ENA (693)	<i>Manihot utilissima</i>
<i>Xanthomonas phaseoli</i>	XP1	ESALQ	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	XP2	ESALQ	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	XP3	IAC	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Xanthomonas phaseoli</i> f. <i>fuscans</i>	XPf1	IAC	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Xanthomonas phaseoli</i> f. <i>sojensi</i>	XPsl	IAC	<i>Glycine sojae</i>
<i>Xanthomonas pruni</i>	XPr1	ENA (628)	<i>Prunus amygdalus</i>
<i>Xanthomonas rubrilineans</i>	XR1	ESALQ	<i>Saccharum</i> sp
<i>Xanthomonas vesicatoria</i> **	XV1	ENA (76)	<i>Lycopersicon esculentum</i>
	XV2	ENA (804)	<i>Capsicum annuum</i>
	XV3	ENA (734)	<i>Capsicum annuum</i>
	XV4	ENA (818)	<i>Capsicum annuum</i>
	XV5	ENA (833)	<i>Capsicum annuum</i>
	XV6	ENA (985)	<i>Capsicum annuum</i>
	XV7	ESALQ	<i>Lycopersicon esculentum</i>
	XV8	ESALQ	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>Pseudomonas cichorii</i>	PC1	ESALQ	<i>Lactuca sativa</i>
<i>Pseudomonas glycinea</i>	PG1	ESALQ	<i>Glycine sojae</i>
<i>Pseudomonas mori</i>	PM1	ESALQ	<i>Morus</i> sp

(continua)

(continuação)

Espécies	Linhagem	Origem da Cultura *	Hospedeiro
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	PS1	ESALQ	<i>Solanum tuberosum</i>
	PS2	ESALQ	<i>Solanum tuberosum</i>
	PS3	ESALQ	<i>Solanum tuberosum</i>
	PS4	IZ (109 D)	<i>Solanum tuberosum</i>
	PS5	IZ (49 B)	<i>Solanum tuberosum</i>
<i>Pseudomonas syringae</i>	PSy1	ESALQ	<i>Citrus</i> sp
<i>Corynebacterium michiganense</i>	CM1	ESALQ	<i>Lycopersicum esculentum</i>
	CM2	ESALQ	<i>Lycopersicum esculentum</i>
	CM3	ESALQ	<i>Lycopersicum esculentum</i>
<i>Erwinia carotovora</i>	EC1	ENA (2069)	<i>Daucus carota</i>
	EC2	ESALQ	<i>Daucus carota</i>

* ENA - Escola Nacional de Agronomia. O número entre parênteses é o código usado naquela instituição.

IB - Instituto Biológico de São Paulo. O número entre parênteses é o código usado naquela instituição.

ESALQ - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

IAC - Instituto Agrônômico de Campinas.

IZ - Instituto Zimotécnico (ESALQ). O número e letra entre parênteses são o código usado naquela instituição.

** Os isolados XV1, XV7 e XV8 são específicos de tomateiro (*Lycopersicum esculentum*). Os isolados XV2, XV4, XV5, XV6 são específicos de pimentão (*Capsicum annuum*). O isolado XV3 é patogênico tanto ao tomateiro quanto ao pimentão.

3.2. VARIEDADES DE REPOLHO E PIMENTÃO

As variedades de repolho (Brassica oleracea var. capitata) e pimentão (Capsicum annuum) usadas neste trabalho, assim como a procedência das mesmas, encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Variedades de repolho e pimentão

Espécie	Variedade	Procedência
Brassica oleracea var. capitata	Louco de Verão R-1-73	Instituto de Genética ESALQ
Brassica oleracea var. capitata	Chato de Quintal	Importadora Top Seed
Brassica oleracea var. capitata	Chato de Quintal	Oswaldo Felipe & Filho
Brassica oleracea var. capitata	Chato Sucessão	Sementes Corradini
Capsicum annuum	Ikeda	Sementes Horticeres

3.3. MEIOS DE CULTURA

Dependendo do tipo de ensaio foram utilizados os seguintes meios de cultura:

- Ágar nutriente. Composição:

peptona	5 g
extrato de carne	3 g
dextrose	10 g
ágar	15 g
água destilada	1000 ml
- Caldo nutriente. Composição: a mesma do ágar nutriente, exceto o ágar.
- Ágar semi-sólido: Composição: a mesma do ágar nutriente, mas com 7,5 g de ágar.

4. MÉTODOS

4.1. ISOLAMENTO DE DETECÇÃO DO FAGO

4.1.1. Isolamento

Bacteriófagos ativos contra bactérias fitopatogênicas têm sido isolados de solo (NEWBOULD, 1952), sementes (SUTTON e KATZNELSON, 1953) e tecido vegetal doente (KLEMENT, 1959). Neste trabalho foi tentado o isolamento de um fago ativo contra Xanthomonas campestris, agente causal da Podridão Negra das Crucíferas, das três fontes citadas acima.

4.1.1.1. Solo

Uma amostra de cerca de 150 g de solo, consistindo de diversas subamostras coletadas próximas de plantas de repolho infectadas com Xanthomonas campestris, foi misturada em caldo nutriente e homogeneizada em liquidificador. O homogeneizado foi enriquecido com uma suspensão de células da linhagem XC5 de Xanthomonas campestris, com 24 horas de idade, e incubado por 48 horas a 28°C. Após esse tempo procedeu-se à centrifugação do homogeneizado a 5000 gravidades por 10 minutos. O sobrenadante sofreu, a seguir, um dos dois processos de purificação seguintes: filtração em filtro Millipore SSWP 02500 ou adição de 2%, volume a volume, de clorofórmio (CROSSE e HINGORANI, 1958). O teste para presença ou ausência de fago foi feito, usando-se como bactéria indicadora a linhagem XC5 de Xanthomonas campestris, conforme técnica descrita no item 4.1.2.2.

4.1.1.2. Semente

Uma amostra de cerca de 10.000 sementes comerciais de repolho foi colocada em caldo nutriente e homogeneizada em liquidificador. O homogeneizado foi enriquecido com uma suspensão de células da linhagem XC5 de Xanthomonas campestris, com 24 horas de idade, e incubado por 48 horas a 28°C. Após esse tempo procedeu-se à centrifugação do homogeneizado a 5000 gravidades por 10 minutos. O sobrenadante sofreu, a seguir, um dos dois processos de purificação descritos em 4.1.1.1. O teste para presença ou ausência de fago, descrito em 4.1.2.2, foi feito usando-se como bactéria indicadora a linhagem XC5 de Xanthomonas campestris.

4.1.1.3. Tecido vegetal doente

Uma amostra de cerca de 150 g de tecido doente, consistindo de diversas subamostras coletadas em várias plantas de repolho infectadas com Xanthomonas campestris, foi colocada em caldo nutriente e homogeneizada em liquidificador. O homogeneizado foi enriquecido com uma suspensão de células da linhagem XC5 de Xanthomonas campestris, com 24 horas de idade, e incubado por 48 horas a 28°C. Após esse tempo procedeu-se à centrifugação do homogeneizado a 5000 gravidades por 10 minutos. O sobrenadante sofreu, a seguir, um dos dois processos de purificação descritos no item anterior. O teste para presença ou ausência de fago, descrito em 4.1.2.2, foi feito usando-se como bactéria indicadora a linhagem XC5 de Xanthomonas campestris.

4.1.2. Detecção

As técnicas descritas aqui foram utilizadas não só na detecção do bacteriófago (testes quantitativo e qualitativo) como também em todos os experimentos nos quais a contagem de placas de lise foi necessária (teste quantitativo). A certeza de se estar trabalhando com uma única linhagem do bacteriófago, e não com uma mistura, foi conseguida fazendo-se 8 repicagens sucessivas a partir de uma mesma placa de lise original.

4.1.2.1. Teste quantitativo

Em tubo de ensaio contendo 3 ml de ágar semi-sólido, mantidos em estado líquido a 46°C em banho-maria, são colocados 0,1 ml de uma diluição apropriada de bacteriófagos e 0,1 ml de uma diluição apropriada da bactéria indicadora. Após suave agitação, o conteúdo do tubo é vertido sobre uma placa de Petri, previamente preparada, com 15 ml de ágar nutriente. Incuba-se a 28°C e, após cerca de 18 horas, faz-se a contagem das placas de lise (modificado de ADAMS, 1959). A suspensão da bactéria indicadora, necessária para a realização do teste, é conseguida através da ressuspensão, em 5 ml de caldo nutriente, de uma cultura com 24 horas da bactéria semeada em ágar nutriente inclinado. A suspensão de bacteriófagos é mantida a 4°C em caldo nutriente e as diluições são feitas no mesmo meio (EISENSTARK e THORN BERRY, 1950; ADAMS, 1959).

4.1.2.2. Teste qualitativo

Em tubo de ensaio contendo 3 ml de ágar semi-sólido, mantidos em estado líquido a 46°C em banho-maria, coloca-se 0,1 ml de uma diluição apropriada da bactéria indicadora. Após suave agitação, o conteúdo do tubo é vertido sobre uma placa de Petri, previamente preparada, com 15 ml de ágar nutrien-

te. Após o endurecimento do ágar semi-sólido, com uma alça de platina, colocam-se gotas de uma suspensão suspeita de ter bacteriófagos sobre a superfície da placa. A presença de bacteriófagos é detectada pela ausência de crescimento bacteriano nos locais onde foram colocadas as gotas (STOLP e STARR, 1964).

4.2. PREPARAÇÃO DE ESTOQUE DE FAGO COM ALTO TÍTULO

Foram testados 2 métodos para a obtenção de estoque de bacteriófago com alto título: o primeiro, o método tradicional, consiste em inocular um excesso de partículas fágicas numa cultura de bactérias, em meio líquido, que esteja em fase logarítmica de crescimento. Após 12 horas procede-se à filtração do lisado. O segundo método, idealizado por BERNSTEIN e EISENSTARK (1955), consiste em se conseguir, pelo método descrito em 4.1.2.1, placas de Petri apresentando placas de lise confluentes (aproximadamente 10^5 partículas viáveis por placa). A cada uma dessas placas adicionam-se 3 ml de uma suspensão antiga de fagos e, com uma espátula, procede-se à remoção da camada de ágar semi-sólido da placa de Petri. O material coletado é então triturado em liquidificador por 15 segundos e incubado por 12 horas. A seguir procede-se a uma nova trituração, pelo mesmo tempo, e a uma baixa centrifugação (5000 gravidades) para remover as partículas sólidas e bactérias. Finalmente a mistura é filtrada em filtro Millipore SSWP 02500. Em ambos os métodos foi usada, como bactéria hospedeira, a linhagem XCS de Xanthomonas campestris.

4.3. CARACTERÍSTICAS GERAIS DO FAGO

4.3.1. Morfologia da placa de lise

Para a caracterização da morfologia da placa de lise, resultante da interação bacteriófago-célula hospedeira, empregou-se a técnica descrita em 4.1.2.1, procurando-se colocar, por placa de Petri, aproximadamente 50 partículas viáveis do vírus. Foi observado, além da forma, o diâmetro médio da placa de lise, tendo-se feito cerca de 200 medições. Como hospedeira, nesses ensaios, foram usadas as linhagens XC5 de Xanthomonas campestris e XV2 de Xanthomonas vesicatoria.

4.3.2. Especificidade

Para a determinação do grau de especificidade do bacteriófago usou-se tanto o teste quantitativo (descrito em 4.1.2.1) como o qualitativo (descrito em 4.1.2.2). Todas as espécies e linhagens bacterianas alistadas na Tabela 1 foram utilizadas como hospedeiras. Considerou-se positivo o teste quantitativo, seguindo o critério de WENTWORTH (1963) e STOLP e STARR (1964), quando a "efficiency of plating" (EOP) variou entre 50 e 100%, tomando-se como referência o resultado conseguido com a linhagem XC5 de Xanthomonas campestris a 28°C.

4.3.3. Inativação térmica

A resistência do bacteriófago a altas temperaturas foi medida pelo método recomendado por KLEMENT e LOVAS (1959) que consiste em submeter 5 ml de uma suspensão do bacteriófago, com aproximadamente 10^5 partículas viáveis por ml, a diferentes temperaturas, em banho-maria. Em seguida, com intervalos de tempo determinados, procede-se à determinação do número de partícu

las que ainda permanecem viáveis, conforme descrito em 4.1.2.1. As temperaturas nas quais se fez o experimento foram 50, 55, 60, 65 e 70 graus centígrados e o intervalo de tempo entre uma medição e outra foi de 30 minutos, a partir do início até 240 minutos.

4.3.4. Inativação com ultravioleta e fotorreativação

O efeito da luz ultravioleta sobre o bacteriófago bem como o efeito da luz visível em reativar a partícula do vírus foram determinados segundo técnica descrita por DULBECCO (1950).

A fonte de ultravioleta usada foi uma lâmpara germicida General Electric, cujo comprimento de onda predominante é de 2537 Å. Tomou-se o cuidado, em todos os experimentos, de ligá-la pelo menos 20 minutos antes do início da irradiação das partículas do fago.

Para ser irradiado, o bacteriófago foi diluído em caldo nutriente até a concentração de 10^5 partículas viáveis por ml. Uma alíquota de 3 ml foi tomada e colocada em placa de Petri, sem tampa, submetida a agitação constante. A distância da placa à lâmpada foi de 30 cm e os tempos de irradiação empregados variaram de 5 a 80 segundos, com intervalos de 5 segundos entre um tratamento e outro.

Após a irradiação, o número de partículas fágicas viáveis era determinado através da técnica descrita em 4.1.2.1. A fotorreativação foi medida colocando-se metade das placas de cada tratamento no escuro e a outra metade a 30 cm de distância de 2 lâmpadas fluorescentes Philips TL54RS de 40 W cada. A contagem das placas de lise foi feita 18 horas após.

Os hospedeiros usados nesta série de ensaios foram as linhagens XC5 de Xanthomonas campestris e XV2 de Xanthomonas vesicatoria.

4.3.5. Adsorção

A cinética da adsorção do bacteriófago à célula hospedeira foi determinada nas linhagens XC5 de Xanthomonas campestris e XV2 de Xanthomonas vesicatoria. Para tal misturou-se um excesso de células bacterianas com partículas do fago de tal modo que o título final da suspensão, com relação aos fagos, foi de 10^6 partículas viáveis por ml. Após 5 minutos e até 30 minutos, com 5 minutos de intervalo entre uma determinação e outra, o número de bacteriófagos livres na suspensão foi medido da seguinte maneira: uma alíquota da suspensão original era diluída 10 vezes e centrifugada a 3000 gravidades por 5 minutos (ADAMS, 1959) de tal modo que quase todas as células bacterianas, com os eventuais fagos adsorvidos, eram precipitados. O sobrenadante, que continha os fagos ainda não adsorvidos, era em seguida submetido à técnica da determinação quantitativa do número de partículas de vírus, conforme descrito em 4.1.2.1. A leitura do número de placas de lise, para cada tratamento, era feito após 18 horas. A temperatura na qual se fez o ensaio foi de 28°C.

4.3.6. Curvas de crescimento

A curva de crescimento do bacteriófago foi determinada nas linhagens XC5 de Xanthomonas campestris e XV2 de Xanthomonas vesicatoria, segundo técnica de ELLIS e DELBRUCK (1939). Para tal, um excesso de células bacterianas foi misturado com partículas do bacteriófago de maneira que a relação bactéria-vírus resultasse em aproximadamente 10:1. Após 25 minutos, quando a maioria das partículas do fago provavelmente já se adsorveu às células bacterianas, a mistura foi diluída 10.000 vezes a fim de reduzir drasticamente as chances de encontro entre células bacterianas e partículas de fago. A seguir, o número de fagos livres na suspensão foi determinado através da centrifugação de uma alíquota da mesma por 5 minutos a 3000 gravidades (ADAMS, 1959) e posterior contagem do número de partículas viáveis de vírus

existente no sobrenadante, conforme descrito em 4.3.5.

Quando a bactéria hospedeira empregada foi Xanthomonas campestris os tempos de amostragem para a determinação do número de partículas fágicas na suspensão foram 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 e 300 minutos. No caso da bactéria hospedeira ser Xanthomonas vesicatoria os tempos foram 30, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 360, 390, 420, 450, 480, 510, 540, 570, 600 e 630 minutos. O número de bacteriófagos viáveis existente em cada tempo foi determinado pela técnica descrita em 4.1.2.1.

O cálculo do "burst size" do bacteriófago, tanto no caso da hospedeira ser Xanthomonas campestris quanto no caso dela ser Xanthomonas vesicatoria, foi feito segundo LURIA e DARNELL JR. (1967) através da fórmula:

$$BS = \frac{F - U}{I - U} \text{ onde}$$

BS = "burst size";

F = número final de partículas viáveis de vírus;

U = número de partículas viáveis de vírus não adsorvidas e

I = número de partículas viáveis de vírus durante o período latente, ou seja, partículas adsorvidas e não adsorvidas.

4.3.7. Lisogenia

Durante os testes de especificidade do bacteriófago, descritos em 4.3.2, constatou-se que a linhagem XC4 de Xanthomonas campestris, quando diante do fago, podia apresentar placas de lise turvas. É largamente conhecido que placas de lise desse tipo indicam, na maioria das vezes, que a bactéria tornou-se lisogênica (JACOB e WOLLMAN, 1959a; OKABE e GOTO, 1963).

Para comprovar esse fato, isolou-se uma colônia bacteriana proveniente

do centro de uma placa turva e, com a finalidade de se evitar possíveis partículas do vírus adsorvidas às células bacterianas, procedeu-se a 12 repicagens sucessivas (SUTTON e QUADLING, 1963) antes de dois testes para lisogenia serem feitos. O primeiro teste, baseado em trabalho de SUTTON e QUADLING (1963), consistiu em se cultivar, em caldo nutriente por 24 horas a 28°C, células bacterianas provenientes da 12ª repicagem. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 3.000 gravidades por 5 minutos e o sobrenadante passado através de um filtro Millipore SSWP 02500. O filtrado foi testado para presença do fago, segundo técnica descrita em 4.1.2.1, usando-se como bactéria indicadora a linhagem XC5 de Xanthomonas campestris. O segundo teste, baseado na característica de fagos temperados tornarem-se líticos quando submetidos à irradiação com ultravioleta (LWOFF, SIMINOVICH e KJELDGAARD, 1950; LWOFF, 1953), consistiu em se submeter 3 ml de uma suspensão de células bacterianas, provenientes da 12ª repicagem, a 15 segundos de irradiação com ultravioleta. A distância da placa, mantida aberta durante os 15 segundos de irradiação e em agitação constante, à fonte de ultravioleta foi de 30 cm. Esta consistiu de uma lâmpada germicida General Electric cujo comprimento de onda predominante é de 2537 Å. Tomou-se o cuidado, em todos os experimentos, de ligá-la pelo menos 20 minutos antes do início da irradiação das partículas do fago. Em seguida à irradiação, as células bacterianas foram cultivadas em caldo nutriente por 24 horas a 28°C. Após esse tempo, a suspensão resultante foi centrifugada a 3000 gravidades por 5 minutos e o sobrenadante passado através de um filtro Millipore SSWP 02500. O filtrado foi testado para presença de fago, segundo técnica descrita em 4.1.2.1, usando-se como bactéria indicadora a linhagem XC5 de Xanthomonas campestris.

4.3.8. Morfologia da partícula

Para o exame do fago ao microscópio eletrônico partiu-se de uma suspensão de fagos com alto título conseguida pelo método de BERNSTEIN e EISENSTARK (1955), conforme descrito em 4.2. Essa suspensão foi submetida a uma baixa centrifugação (cerca de 3000 gravidades por 30 minutos) e o sobrenadante, em seguida, foi submetido a uma alta centrifugação (cerca de 26000 gravidades por 60 minutos). O precipitado resultante foi dissolvido em solução fisiológica (pH = 7,4) e examinado ao microscópio eletrônico (ELMISKOP SIEMENS IA) pelo método da coloração negativa com ácido fosfotungstíco (pH = 7,0). O exame foi realizado utilizando-se uma diferença de potencial de 100 KV e as fotos foram focalizadas através de 3 etapas do controle da objetiva mais fino. Diversas fotografias foram obtidas com abertura da objetiva de 5 nm e com diversos aumentos.

4.4. DETECÇÃO DE XANTHOMONAS CAMPESTRIS EM SEMENTES DE REPOLHO ATRAVÉS DE FAGOS

O método de detecção de bactérias fitopatogênicas em sementes, usado neste experimento, deriva, com algumas modificações, do trabalho de KATZNELSON (1950), como se verá a seguir: uma quantidade determinada de sementes de repolho é colocada em 50 ml de caldo nutriente e triturada por 5 minutos num "omni-mixer". A suspensão resultante é incubada por algumas horas, após as quais uma alíquota de 9 ml é retirada. A essa alíquota adiciona-se 1 ml de uma suspensão de bacteriófago com título de, aproximadamente, $5 \cdot 10^3$ partículas viáveis por ml. Pelo método descrito em 4.1.2.1, usando-se a linhagem XC5 de Xanthomonas campestris como indicadora, faz-se a determinação do número de partículas viáveis de fago existente na suspensão logo após a adição do bacteriófago e após cerca de 12 horas dele ter sido adicionado. Antes disso, em ambos os casos, procede-se à centrifugação da suspensão (3.000 gravidades) por 10 minutos. Um aumento do número de placas

de lise entre a primeira determinação e a segunda indica a presença de Xanthomonas campestris no lote de sementes examinado.

KATZNELSON (1950), em seu trabalho com sementes de feijão infectadas com Xanthomonas phaseoli e Pseudomonas phaseolicola, usou 50 sementes e deixou, pelo menos, 12 horas a suspensão de sementes trituradas incubando antes de proceder à adição das partículas do fago. Essas, o número de sementes e o número de horas que o triturado de sementes deve ficar incubando, são as únicas duas variáveis que precisam ser determinadas para cada combinação semente-bactéria, já que as demais permanecem inalteradas seja qual for a combinação. Em vista disso, foram idealizados os ensaios descritos a seguir para a determinação do número mínimo de sementes de repolho e do tempo mínimo de incubação do triturado de sementes para que bons resultados sejam conseguidos na combinação sementes de repolho - Xanthomonas campestris. Para tal foram realizados 3 ensaios nos quais foram usados 7 lotes de sementes, identificados por L1, L2, L3, L4, L5, L6 e L7, que estão caracterizados na Tabela 3.

4.4.1. Determinação do tamanho da amostra

Seguindo o método descrito em 4.4, para a detecção de Xanthomonas campestris no interior de sementes de repolho, foram testadas amostras de 500, 1000, 1500, 2000, 2500 e 5000 sementes de cada um dos 7 lotes caracterizados na Tabela 3. O tempo de incubação da suspensão de sementes trituradas, em caldo nutriente, foi sempre de 12 horas.

Tabela 3 - Caracterização dos 7 lotes de sementes de repolho usados nos testes de detecção de Xanthomonas campestris através de bacteriófagos

Lote	Variedade	Procedência	Observação
L1	Louco de Verão	Instituto de Genética da ESALQ	Sementes obtidas de plantas fortemente atacadas por <u>Xanthomonas campestris</u>
L2	Louco de Verão	Instituto de Genética da ESALQ	Sementes obtidas de plantas saudáveis
L3	Chato Sucessão	Sementes Corradini	Semente comercial
L4	Chato de Quintal	Oswaldo Felipe & Filho	Semente comercial
L5	Chato de Quintal	Importadora Top Seed	Semente comercial
L6	Louco de Verão	Instituto de Genética da ESALQ	Mistura de 50% L1 e 50% L2
L7	Louco de Verão	Instituto de Genética da ESALQ	Mistura de 10% L1 e 90% L2

4.4.2. Determinação do tempo de incubação

Seguindo o método descrito em 4.4, para a detecção de Xanthomonas campestris no interior de sementes de repolho, foram testados os tempos de incubação de 6, 12, 18, 24, 36 e 48 horas para a suspensão de sementes trituradas em caldo nutriente. O tamanho da amostra foi sempre de 2000 sementes e foram utilizadas sementes de todos os 7 lotes caracterizados na Tabela 3.

4.4.3. Determinação do efeito de uma pequena amostra associada a um longo período de incubação

Seguindo o método descrito em 4.4, para a detecção de Xanthomonas campestris no interior de sementes de repolho, foram testadas amostras de 500, 1000 e 1500 sementes de cada um dos 7 lotes caracterizados na Tabela 3. O tempo de incubação da suspensão de sementes trituradas, em caldo nutriente, foi sempre de 36 horas.

4.5. CONTROLE DAS DOENÇAS CAUSADAS POR XANTHOMONAS CAMPESTRIS EM REPOLHO E XANTHOMONAS VESICATORIA EM PIMENTÃO ATRAVÉS DO FAGO

Para se avaliar a eficiência do bacteriófago no controle das doenças causadas em repolho e pimentão por Xanthomonas campestris e Xanthomonas vesicatoria, respectivamente, foram usadas as linhagens XC5 e XV2 dos patógenos e as variedades Louco de Verão R-1-73 e Ikeda dos hospedeiros.

Os ensaios, em ambos os casos, constituíram-se de 15 tratamentos (T7, T6, T5, T4, T3, T2, T1, T0, T+1, T+2, T+3, T+4, TB, TF e TT) que se encontram caracterizados na Tabela 4. Cada tratamento compôs-se de 3 vasos com duas a seis plantas cada um. As inoculações, tanto do bacteriófago como da bactéria, foram feitas por pulverização de 10 ml de suspensão com título de 10^6 partículas e 10^5 células por ml, respectivamente de vírus e bactérias, em cada tratamento. A avaliação da doença foi realizada logo após o aparecimento dos sintomas por contagem do número das lesões necróticas por planta.

Tabela 4 - Caracterização dos tratamentos dos ensaios de controle de Xanthomonas campestris e Xanthomonas vesicatoria pelo bacteriófago

Tratamentos	Caracterização
T7, T6, T5, T4, T3, T2 e T1	Os números que aparecem em seguida ao T (tratamento) indicam o número de dias que o fago foi inoculado sobre a planta antes da bactéria
T0	Fago e bactéria foram inoculados ao mesmo tempo
T+1, T+2, T+3 e T+4	Os números que aparecem em seguida ao sinal + indicam o número de dias que o fago foi inoculado sobre a planta depois da bactéria
TB	Só bactéria foi inoculada
TF	Só fago foi inoculado
TT	Testemunha

5. RESULTADOS

5.1. ISOLAMENTO E DETECÇÃO DO FAGO

Os resultados obtidos na tentativa de isolamento de um bacteriófago ativo contra Xanthomonas campestris com amostras de solo, tecido doente e sementes de repolho, conforme descrito em 4.1, encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados dos ensaios para detecção de um bacteriófago ativo contra Xanthomonas campestris em amostras de solo, tecido doente e sementes de repolho

Material usado	Método de purificação	Resultado
Solo	Filtragem	-
	Clorofórmio	-
Tecido doente	Filtragem	+
	Clorofórmio	+
Semente	Filtragem	-
	Clorofórmio	-

+ = presença de placa de lise

- = ausência de placa de lise

5.2. PREPARAÇÃO DE ESTOQUE DE FAGO COM ALTO TÍTULO

Pelo método tradicional, descrito em 4.2, conseguiu-se uma suspensão de bacteriófagos com um título máximo de $6,0 \cdot 10^8$ partículas viáveis por ml ao passo que, usando-se o método de BERNSTEIN e EISENSTARK (1955), também descrito em 4.2, conseguiu-se um título máximo de $8,5 \cdot 10^{10}$ partículas viáveis por ml.

5.3. CARACTERÍSTICAS GERAIS DO FAGO

5.3.1. Morfologia da placa de lise

Tanto no caso da bactéria hospedeira ser a linhagem XC5 de Xanthomonas campestris como no caso de ser XV2 de Xanthomonas vesicatoria as placas de lise produzidas pelo bacteriófago apresentam a forma circular, com bordos bem nítidos e têm seu interior absolutamente livre de crescimento bacteriano (Figura 1). O diâmetro médio da placa foi de 1-1,5 mm e 3 mm para Xanthomonas campestris e Xanthomonas vesicatoria, respectivamente.

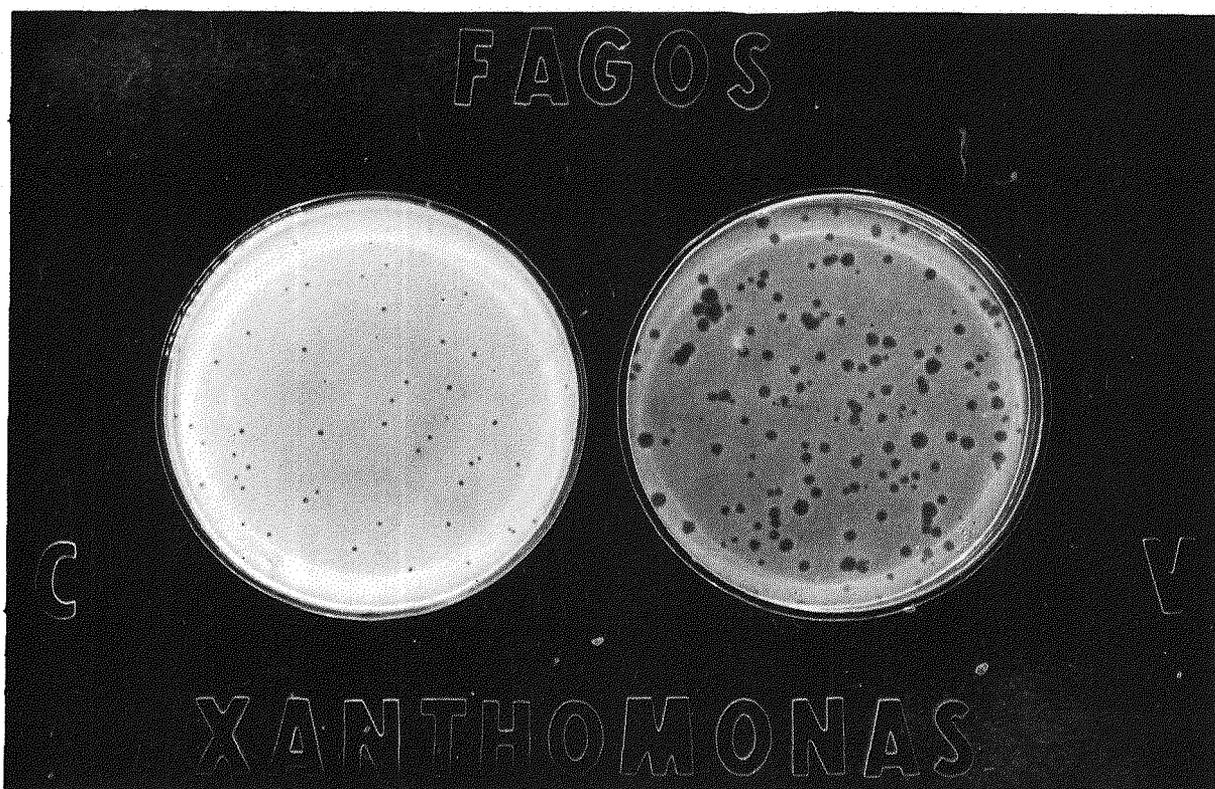


Figura 1 - Morfologia da placa de lise causada pelo bacteriófago sobre Xanthomonas campestris (esquerda) e Xanthomonas vesicatoria (direita).

5.3.2. Especificidade

Os resultados do teste de especificidade do bacteriófago, efetuado conforme descrito em 4.3.2, encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultados do teste, quantitativo e qualitativo, de especificidade do bacteriófago frente a diversas espécies e linhagens bacterianas.

Espécie	Linhagem	Teste Qualitativo	Teste Quantitativo
<i>Xanthomonas albilineans</i>	XA1	-	-
<i>Xanthomonas campestris</i>	XC1	+	-
	XC2	+	-
	XC3	+	+
	XC4	+	-
	XC5	+	+
	XC6	+	+
<i>Xanthomonas citri</i>	XCi1	-	-
	XCi2	-	-
	XCi3	-	-
	XCi4	-	-
	XCi5	+	-
<i>Xanthomonas malvacearum</i>	XM1	-	-
	XM2	-	-
<i>Xanthomonas manihotis</i>	XM1	-	-
	XM2	-	-
<i>Xanthomonas phaseoli</i>	XP1	-	-
	XP2	-	-
	XP3	-	-
<i>Xanthomonas phaseoli</i> f. <i>fuscans</i>	XPf1	-	-
<i>Xanthomonas phaseoli</i> f. <i>sojensi</i>	XPsl	-	-
<i>Xanthomonas pruni</i>	XPr1	-	-

(continua)

(Continuação)

Espécie	Linhagem	Teste Qualitativo	Teste Quantitativo
Xanthomonas rubrilineans	XR1	-	-
Xanthomonas vesicatoria	XV1	-	-
	XV2	+	+
	XV3	-	-
	XV4	+	+
	XV5	+	+
	XV6	+	+
	XV7	-	-
	XV8	-	-
Pseudomonas cichorii	PC1	-	-
Pseudomonas glycinea	PG1	-	-
Pseudomonas mori	PM1	-	-
Pseudomonas solanacearum	PS1	-	-
	PS2	-	-
	PS3	-	-
	PS4	-	-
	PS5	-	-
Pseudomonas syringae	PSy1	-	-
Corynebacterium michiganense	CM1	-	-
	CM2	-	-
	CM3	-	-
Erwinia carotovora	EC1	-	-
	EC2	-	-

+ = presença de placa de lise

- = ausência de placa de lise

5.3.3. Inativação térmica

Os resultados dos testes de inativação térmica do bacteriófago, descritos em 4.3.3, estão representados graficamente na Figura 2. Os dados originais encontram-se no Apêndice 1.

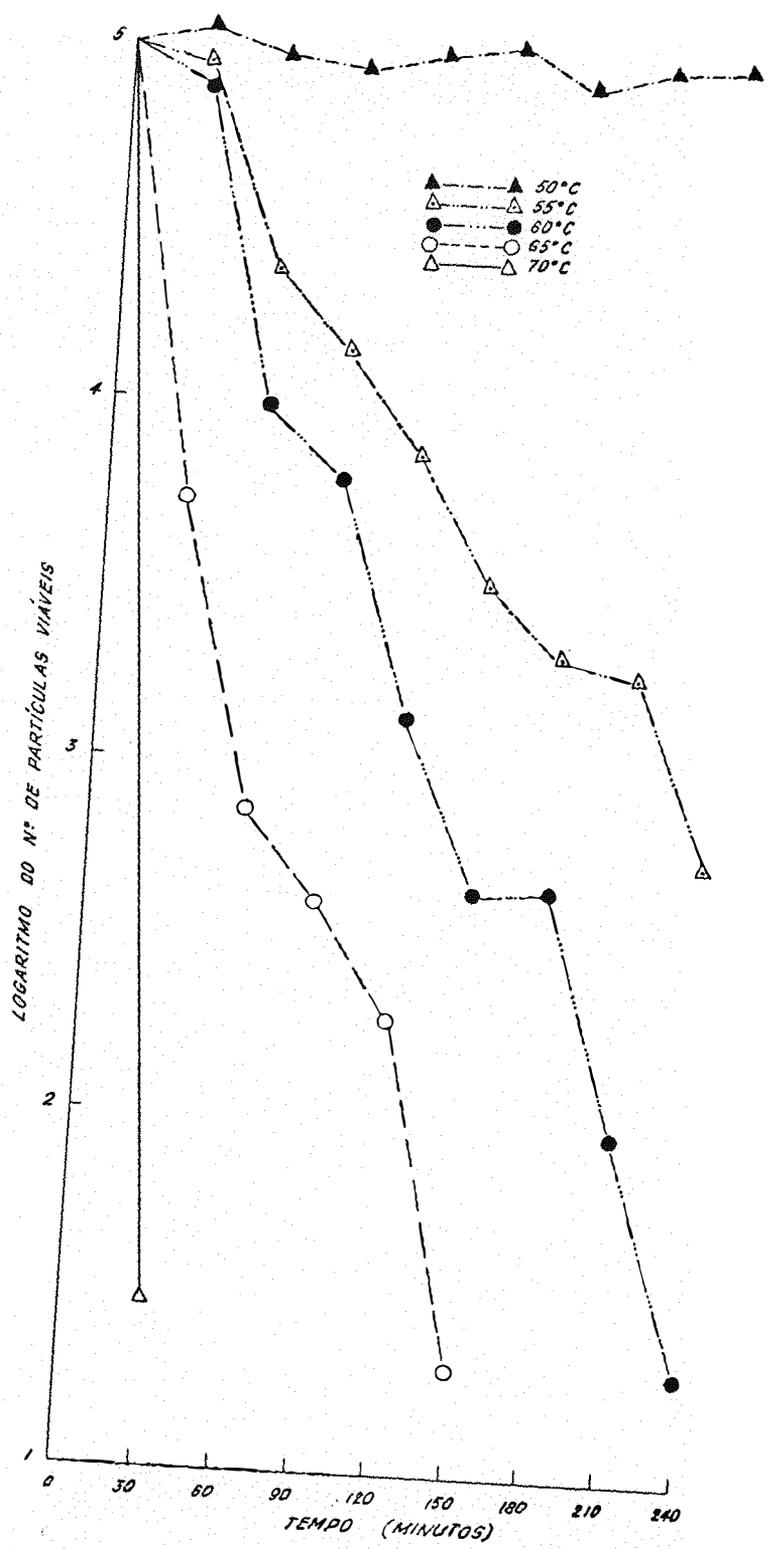


Figura 2 - Efeito de diversos tempos de exposição a diversas temperaturas sobre o número de partículas viáveis do fago

5.3.4. Inativação com ultravioleta e fotorreativação

Os resultados dos testes de inativação do bacteriófago com luz ultravioleta e posterior reativação sob a ação da luz visível, descritos em 4.3.4, encontram-se no Apêndice 2 e Figura 3 quando Xanthomonas campestris foi usada como hospedeira e no Apêndice 3 e Figura 4 quando a hospedeira foi Xanthomonas vesicatoria.

5.3.5. Adsorção

Os resultados dos ensaios sobre cinética da adsorção do bacteriófago à célula hospedeira, descritos em 4.3.5, encontram-se no Apêndice 4 para o caso de Xanthomonas campestris e no Apêndice 5 para o caso de Xanthomonas vesicatoria. A Figura 5 representa graficamente ambos os ensaios.

5.3.6. Curvas de crescimento

Os resultados dos ensaios sobre o crescimento do bacteriófago, conforme descrito em 4.3.6, tendo como hospedeira Xanthomonas campestris, encontram-se no Apêndice 6 e Figura 6. Para o caso da hospedeira ser Xanthomonas vesicatoria os resultados estão no Apêndice 7 e Figura 7.

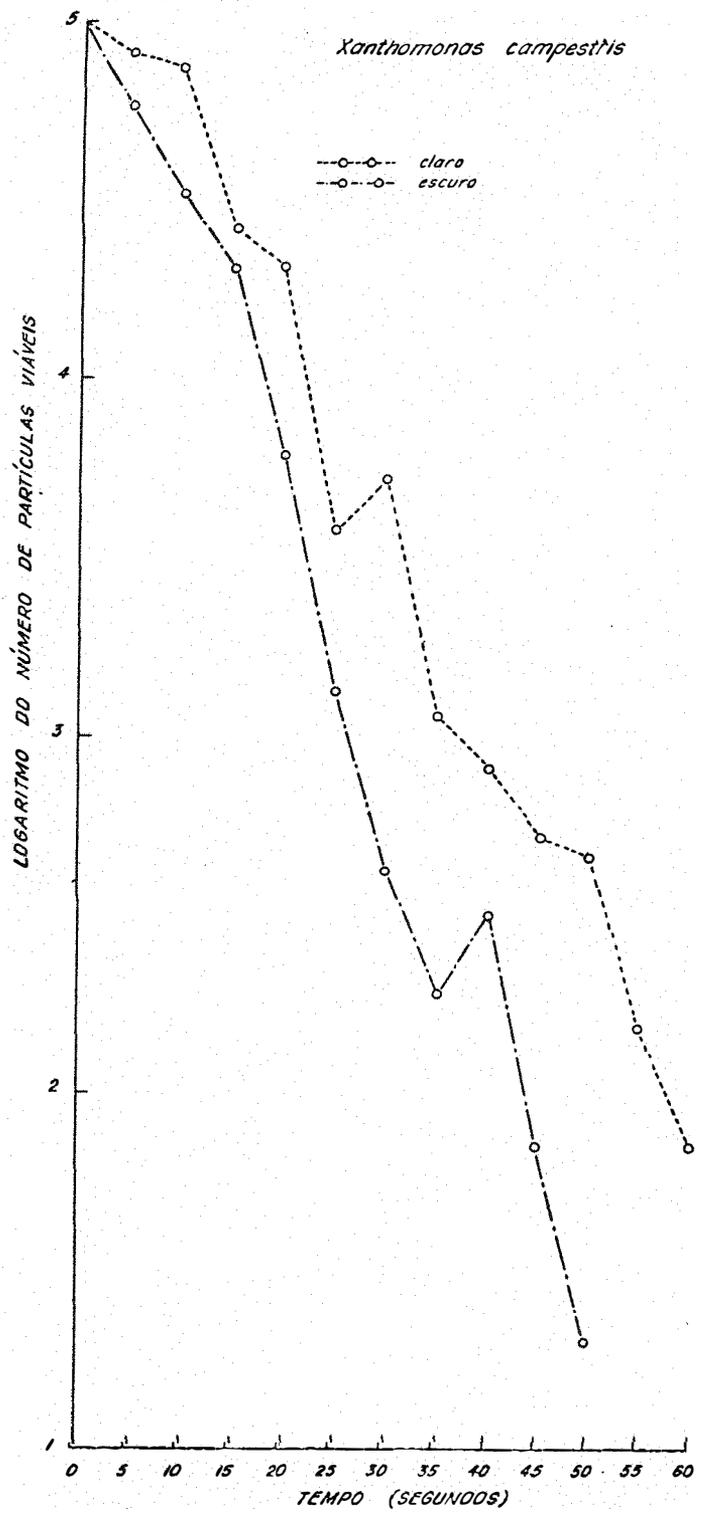


Figura 3 - Efeito de exposição à luz ultravioleta e da fotorreativação na viabilidade do bacteriófago inoculado em Xanthomonas campestris.



Figura 4 - Efeito de exposição à luz ultravioleta e da fotorreativação na viabilidade do bacteriófago inoculado em Xanthomonas vesicatoria

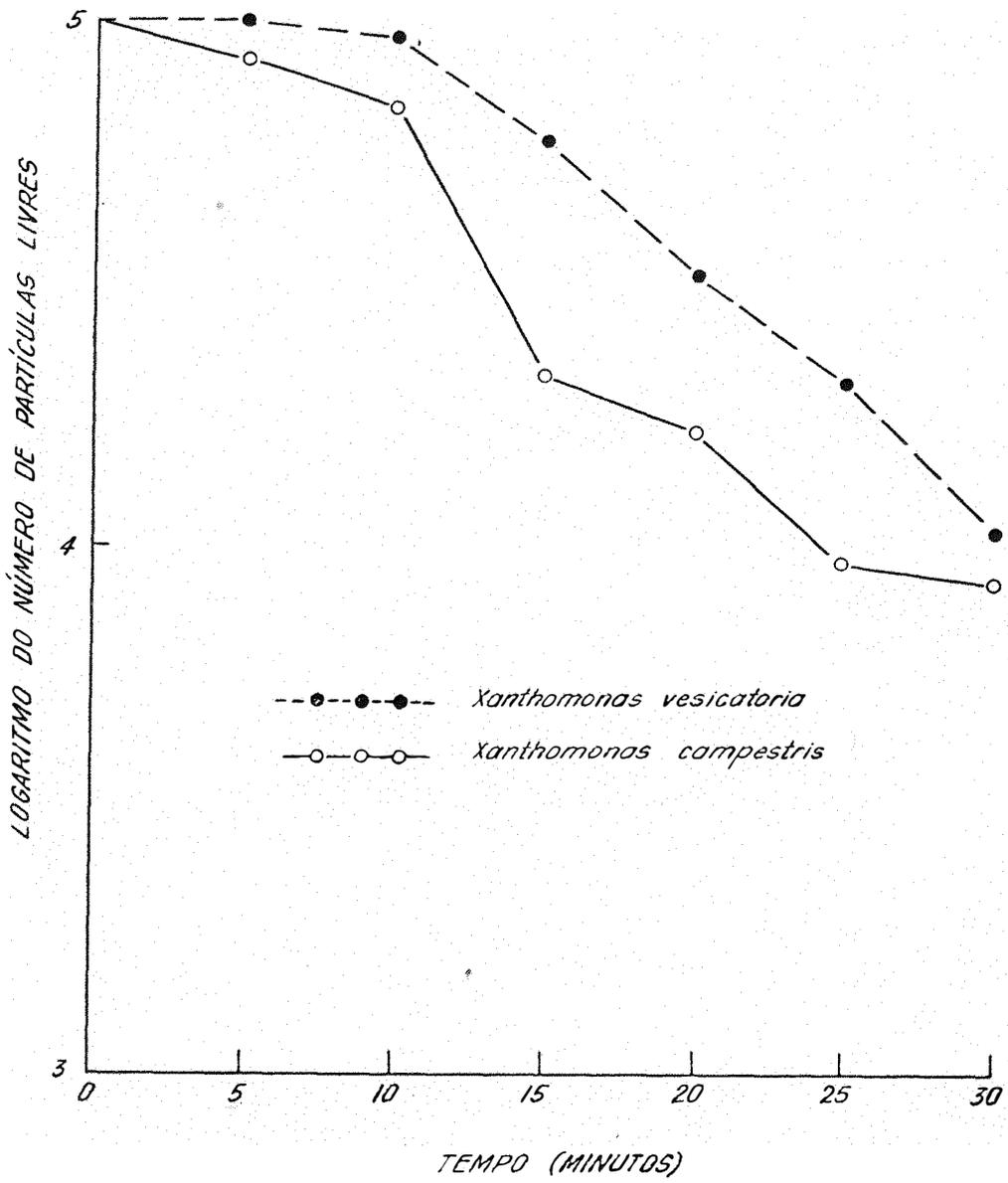


Figura 5 - Número de partículas de vírus livres, em diversos tempos, quando misturadas com um excesso de Xanthomonas campestris, em um caso, e Xanthomonas vesicatoria, em outro caso.

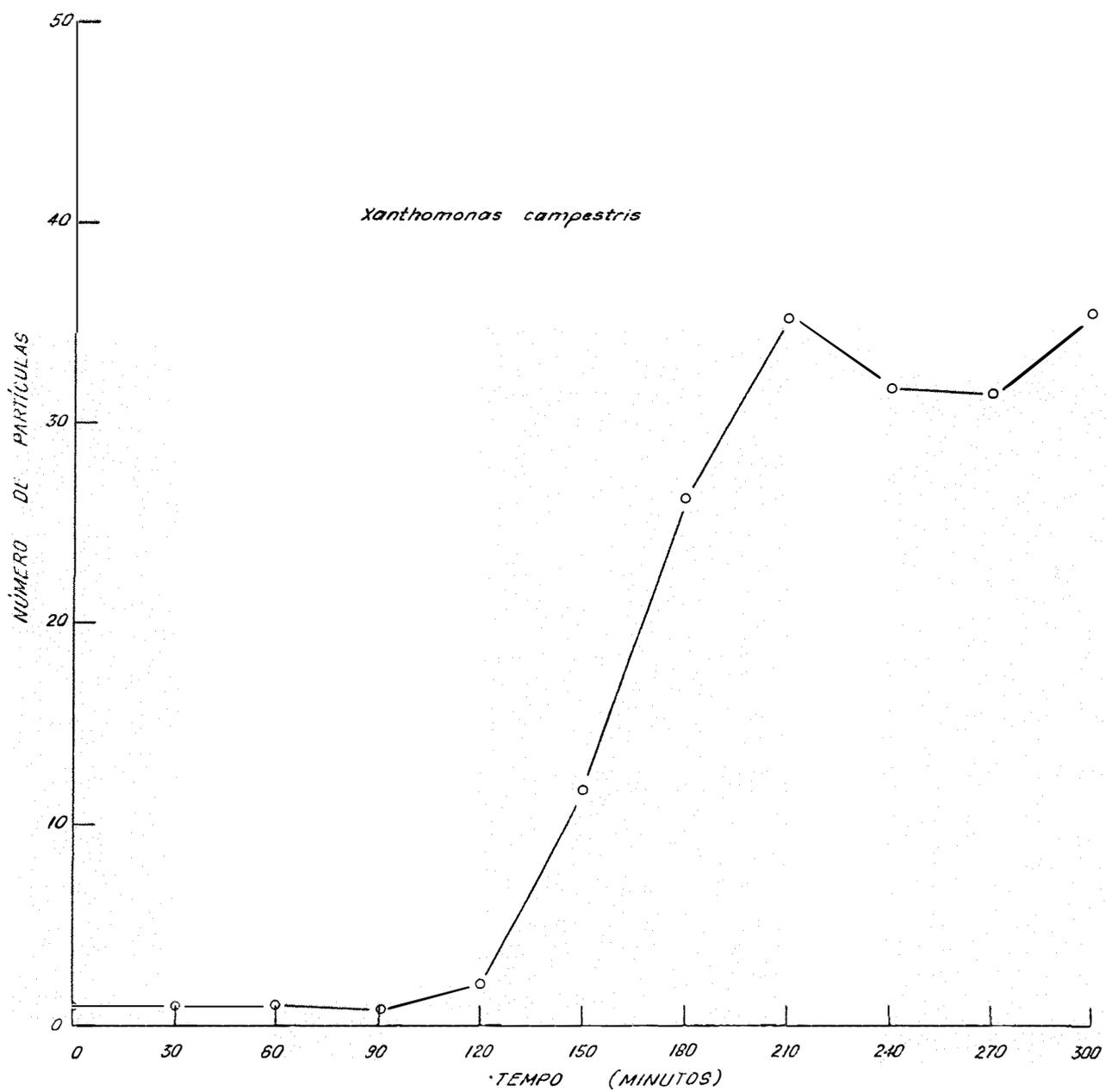


Figura 6 - Curva de crescimento do bacteriófago com Xanthomonas campestris como hospedeira

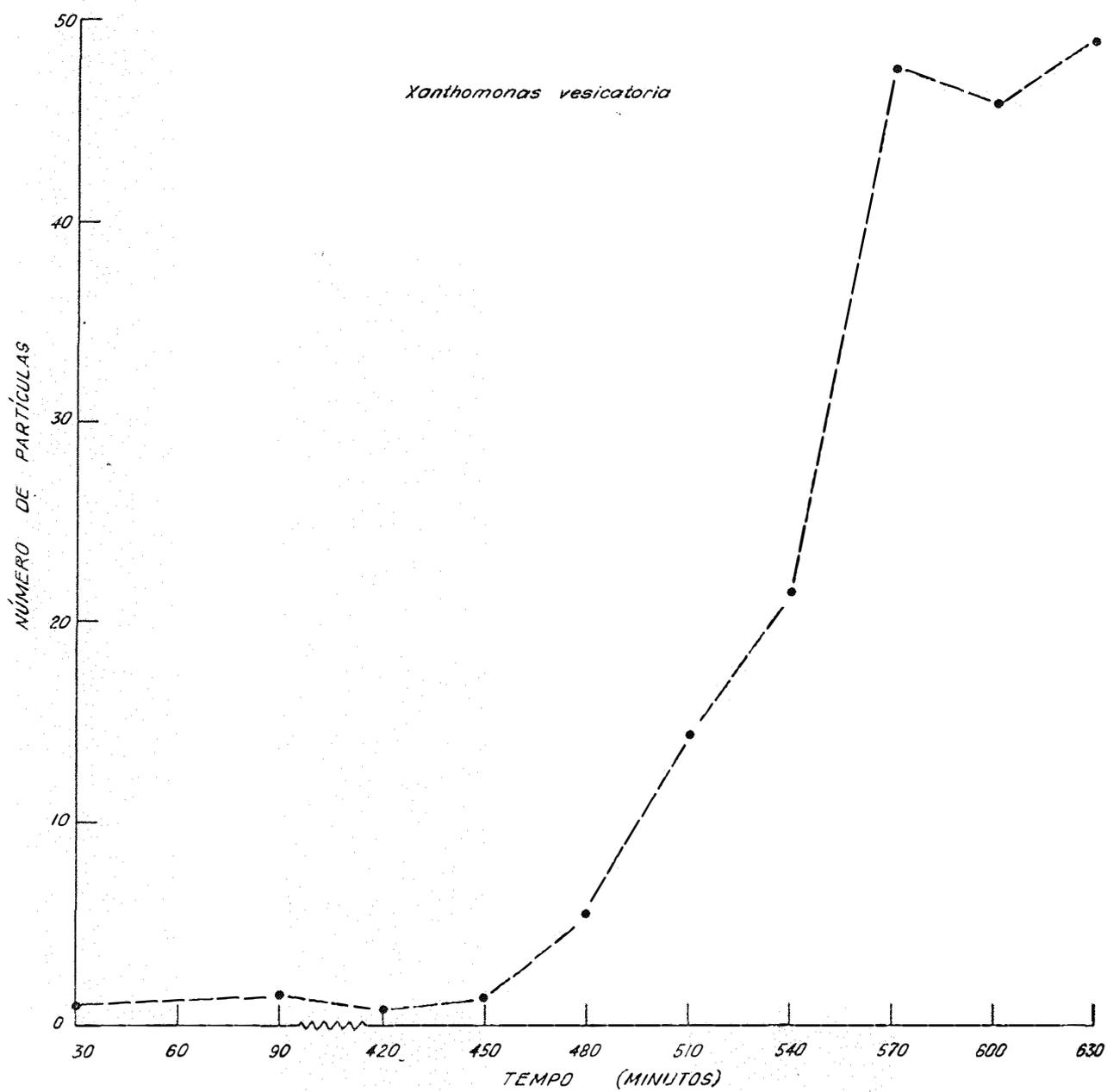


Figura 7 - Curva de crescimento do bacteriófago com Xanthomonas vesicatoria como hospedeira.

5.3.7. Lisogenia

Os resultados dos testes para lisogenia com a combinação bacteriófago e linhagem XC4 de Xanthomonas campestris, descritos em 4.3.7, encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 - Número de partículas viáveis de vírus formadas a partir de células de Xanthomonas campestris com e sem indução com ultravioleta

Repetição	Sem ultravioleta	Com ultravioleta
	Número de partículas por ml	Número de partículas por ml
1	$5,50 \cdot 10^1$	$8,70 \cdot 10^1$
2	$3,20 \cdot 10^1$	$9,90 \cdot 10^1$
3	$2,80 \cdot 10^1$	$1,16 \cdot 10^2$
4	$6,10 \cdot 10^1$	$1,03 \cdot 10^2$
5	$1,70 \cdot 10^1$	$5,30 \cdot 10^1$
6	$2,10 \cdot 10^1$	$1,32 \cdot 10^2$
7	$1,30 \cdot 10^1$	$3,80 \cdot 10^1$
Média	$3,24 \cdot 10^1$	Média $8,97 \cdot 10^1$

5.3.8. Morfologia da partícula

As fotomicrografias eletrônicas da partícula do vírus, conseguidas usando-se as técnicas descritas em 4.3.8, e esquemas da partícula com bainha contraída e distendida encontram-se na Figura 8.

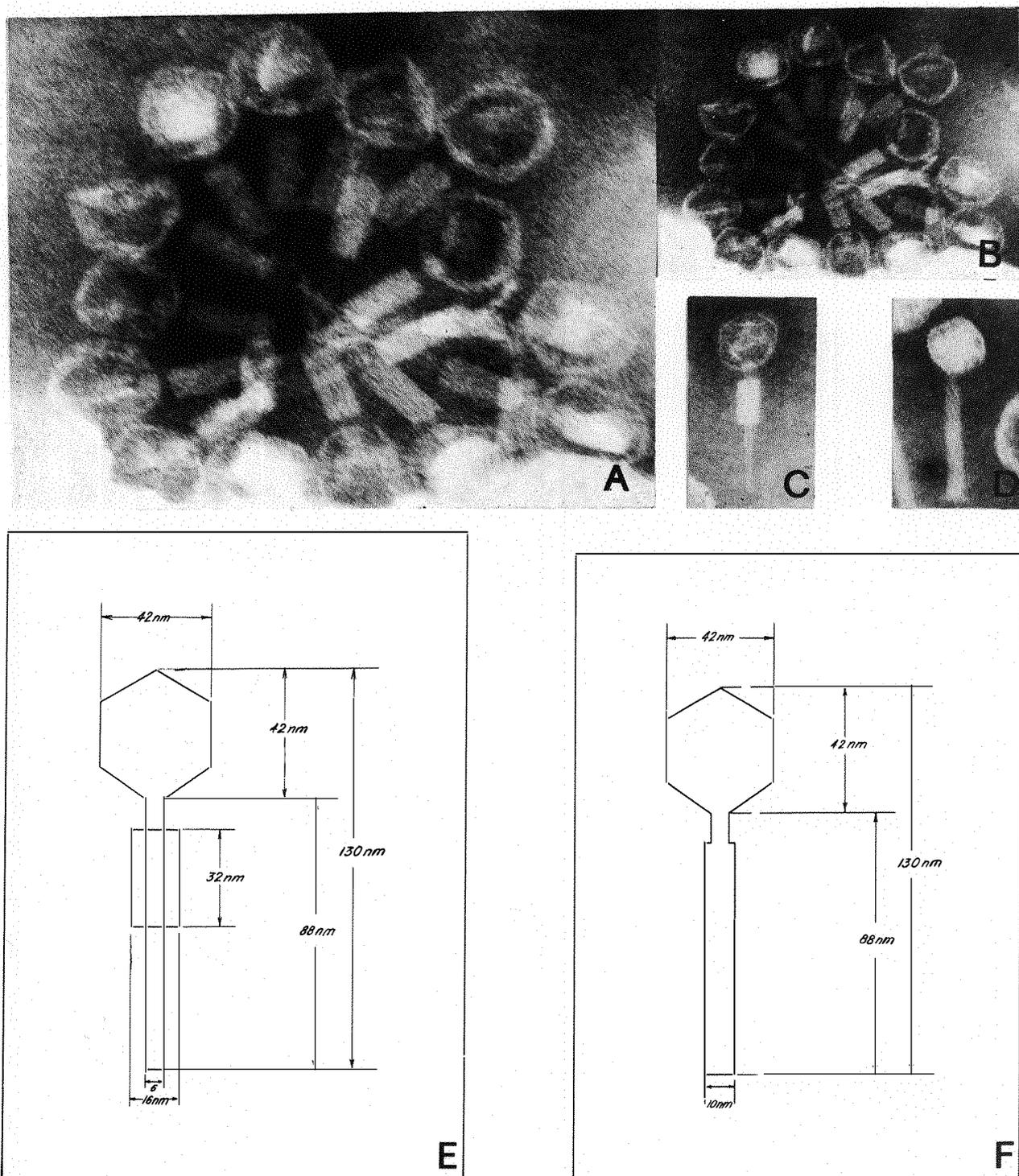


Figura 8 - Fotomicrografias eletrônicas e esquemas da partícula do Vírus. A. Diversas partículas do fago (aumento de 354.000 vezes). B. Diversas partículas do fago (aumento de 177.000 vezes). C. Partícula com bainha contraída (aumento de 177.000 vezes). D. Partícula com bainha distendida (aumento de 177.000 vezes). E. Esquema da partícula com bainha contraída. F. Esquema da partícula com bainha distendida. (fotomicrografias eletrônicas feitas no Setor de Microscopia Eletrônica do CENA - Centro de Energia Nuclear na Agricultura).

5.4. DETECÇÃO DE XANTHOMONAS CAMPESTRIS EM SEMENTES DE REPOLHO ATRAVÉS DE FAGOS

Os resultados dos 3 ensaios feitos para o estudo da viabilidade do uso de bacteriófagos na detecção de Xanthomonas campestris em sementes de repolho, descritos em 4.4, estão apresentados nos 3 itens seguintes:

5.4.1. Determinação do tamanho da amostra

As variações nos resultados do teste de detecção do patógeno em sementes de repolho, descrito em 4.4.1, devidas a 6 diferentes tamanhos de amostra, aparecem quantitativamente na Tabela 7.

Tabela 7 - Efeito do tamanho da amostra na detecção de Xanthomonas campestris por fagos em diferentes lotes de sementes de repolho.

Tamanho da amostra (Nº de sementes)	Variação do número de placas de lise em cada lote *													
	L1		L2		L3		L4		L5		L6		L7	
	0**	12***	0	12	0	12	0	12	0	12	0	12	0	12
500	53	330	49	51	48	36	55	46	49	26	49	25	62	38
1000	41	347	56	32	47	51	51	54	60	42	47	26	49	49
1500	45	690	50	25	52	50	48	37	49	50	50	54	56	50
2000	47	c	47	60	39	26	50	705	51	38	45	c	39	25
2500	46	c	38	12	35	28	53	c	45	25	42	c	49	48
5000	39	c	39	17	32	15	43	c	42	20	46	c	37	28

* média de 2 placas desprezadas as frações menores que 1

*** após 12 horas de incubação
c = placas de lise confluentes

** no tempo 0 de incubação

5.4.2. Determinação do tempo de incubação

As variações nos resultados do teste de detecção do patógeno em sementes de repolho, descrito em 4.4.2, devidas a 6 diferentes tempos de incubação do triturado de sementes, aparecem quantitativamente na Tabela 8.

Tabela 8 - Efeito do período de incubação do triturado de sementes na detecção de Xanthomonas campestris por fagos em diferentes lotes de sementes de repolho (tamanho da amostra de 2000 sementes)

Tempo de incubação (horas)	Variação do número de placas de lise em cada lote *													
	L1		L2		L3		L4		L5		L6		L7	
	0**	TI***	0	TI										
6	56	350	45	49	60	49	45	37	51	26	55	27	47	26
12	52	591	55	35	55	56	50	c	47	40	61	c	61	50
18	48	c	61	20	43	31	51	c	44	38	47	c	51	45
24	53	c	47	38	62	33	55	c	38	30	44	c	37	42
36	60	c	51	40	50	50	53	c	41	50	53	c	52	470
48	51	c	49	48	52	43	47	c	45	50	60	c	44	817

* média de 2 placas desprezadas as frações menores que 1

** no tempo 0 de incubação

*** no tempo de incubação indicado na linha correspondente

c = placas de lise confluentes

5.4.3. Determinação do efeito de uma pequena amostra associada a um longo período de incubação

As variações nos resultados do teste de detecção do patógeno em sementes de repolho, descrito em 4.4.3, devidas a 3 diferentes tamanhos de amostra associados a um longo período de incubação, aparecem quantitativamente na Tabela 9.

Tabela 9 - Efeito de pequena amostra associada a longo período de incubação na detecção de Xanthomonas campestris por fagos em diferentes lotes de sementes de repolho

Tamanho da amostra (Nº de sementes)	Variação do número de placas de lise em cada lote													
	L1		L2		L3		L4		L5		L6		L7	
	0	**36***	0	36	0	36	0	36	0	36	0	36	0	36
500	50	481	62	31	47	20	45	301	61	60	43	690	51	310
1000	48	c	55	51	70	61	47	510	59	61	52	c	49	627
1500	61	c	39	27	59	35	53	c	45	32	35	c	63	731

* média de 2 placas desprezadas as frações menores que 1
** no tempo 0 de incubação

*** após 36 horas de incubação
c = placas de lise confluentes

5.5. CONTROLE DAS DOENÇAS CAUSADAS POR XANTHOMONAS CAMPESTRIS EM REPOLHO E XANTHOMONAS VESICATORIA EM PIMENTÃO ATRAVÉS DO FAGO

Os resultados dos testes de controle dos patógenos pelo bacteriófago, conforme descrito em 4.5, encontram-se na Tabela 10, Figura 9 e Apêndices 8 e 9.

Tabela 10 - Média do número de lesões das plantas de repolho e pimentão inoculadas com Xanthomonas campestris e Xanthomonas vesicatoria e submetidas a diversos tratamentos com o bacteriófago

Tratamento	Médias do número de lesões l	
	<u>X. campestris-repolho</u>	<u>X. vesicatoria-pimentão</u>
T7	352,58	43,68
T6	336,58	39,18
T5	291,67	46,93
T4	227,08	47,28
T3	91,03 **	32,70 *
T2	21,51 **	20,33 **
T1	23,86 **	10,78 **
T0	0,56 **	2,57 **
T + 1	81,82 **	35,20
T + 2	249,72	52,05
T + 3	310,00	46,08
T + 4	296,56	-
TB	328,19	51,65

1. As diferenças mínimas significativas no teste de Tukey para o sistema X. campestris-repolho são, respectivamente, ao nível de 5% e 1%, 144,72 e 172,17. O coeficiente de variação (CV) foi de 21,52%. Para o sistema X. vesicatoria-pimentão as diferenças mínimas significativas são, respectivamente, ao nível de 5% e 1%, 18,11 e 21,87. O coeficiente de variação (CV) foi de 16,89%. A média seguida por um asterisco (*) ou 2 asteriscos (**) difere da média do tratamento TB ao nível de 5 e 1%, respectivamente.

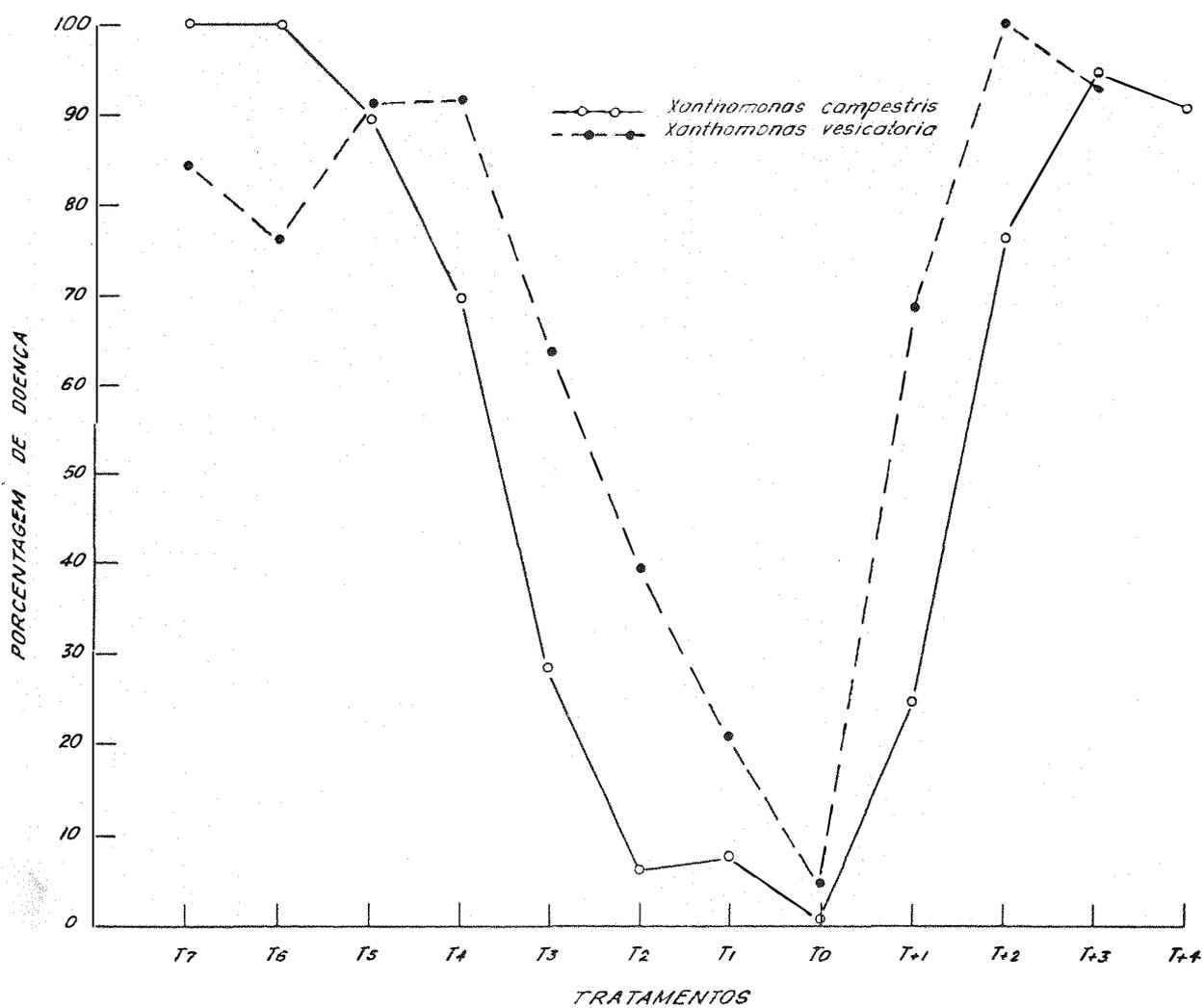


Figura 9 - Representação gráfica da quantidade de doença, expressa em porcentagem, em plantas de repolho e pimentão inoculadas com *Xanthomonas campestris* e *Xanthomonas vesicatoria* e submetidas a diversos tratamentos com o bacteriófago.

6. DISCUSSÃO

6.1. ISOLAMENTO E DETECÇÃO DO FAGO

6.1.1. Os métodos de purificação e a técnica do enriquecimento

O uso do clorofórmio, além do tradicional método de filtração em filtro bacteriológico, com o objetivo de purificar o material incubado para posterior detecção de possíveis partículas fágicas (ver item 4.1) mostrou-se eficiente, como se pode perceber pelos dados apresentados na Tabela 5. Esse resultado, aliás, já era esperado pois, além do trabalho de CROSSE e HINGORANI (1958), no qual a técnica do clorofórmio está descrita, muitos outros autores a vêm usando com sucesso (TAKAHASHI e QUADLING, 1961; HAYWARD, 1964; ECHANDI e SUN, 1973) se bem que exista sempre a ressalva da possível ação inativadora do clorofórmio contra determinados bacteriófagos (ADAMS, 1959; ROVOZZO e BURKE, 1973). Sua maior vantagem, em relação ao filtro bacteriológico, como bem frisaram CROSSE e HINGORANI (1958), é a grande simplificação do método com conseqüente possibilidade de grande número de amostras serem manipuladas concomitantemente. Como, porém, neste trabalho, não foi necessário manejar muitas amostras ao mesmo tempo preferiu-se, para os ensaios subsequentes, o emprego do filtro bacteriológico que elimina as esporádicas contaminações que ocorrem quando do uso do clorofórmio.

Outro aspecto que deve ser sempre levado em consideração, quando do isolamento de fagos, é o enriquecimento (CROSSE e HINGORANI, 1958). As primeiras tentativas efetuadas neste trabalho de se isolar o fago, nas quais não se conseguiu resultado positivo, foram realizadas sem o enriquecimento, que se revelou fundamental devido, provavelmente, ao fato dos bacteriófagos ocorrerem, naturalmente, nas plantas, em número muito pequeno. Daí a necessidade de, com o enriquecimento, aumentar-se a possibilidade de contato entre as poucas partículas do vírus existentes na suspensão e as células da bactéria hospedeira. As conclusões idênticas chegaram CROSSE e HINGORANI (1958).

GORANI (1958), COOK e QUADLING (1959) e SUTTON e WALLEN (1967). Os primeiros, partindo de 12 amostras de solo, só conseguiram sucesso no isolamento de fagos de Pseudomonas morsprunorum após o enriquecimento quando, das 12, 9 amostras deram resultado positivo. COOK e QUADLING (1959), também partindo de 12 amostras de solo, conseguiram sucesso em 3 delas, isolando fagos de Xanthomonas phaseoli, somente após o enriquecimento com células da bactéria hospedeira e, finalmente, SUTTON e WALLEN (1967) conseguiram, de 13 amostras de solo, 17 fagos ativos contra Xanthomonas phaseoli e Xanthomonas phaseoli f. fuscans apenas após terem introduzido a técnica do enriquecimento em seu método de isolamento.

Contrastando com essa exigência obrigatória, o enriquecimento, a necessidade de se proceder a duas, três ou mais passagens do filtrado pela bactéria hospedeira (duplo enriquecimento, triplo enriquecimento, etc.), antes de ser possível a detecção do fago, parece só ser necessária em casos muito particulares (KATZNELSON e SUTTON, 1951; SUTTON, KATZNELSON e QUADLING, 1958; KLEMENT e LOVAS, 1959; KIRÁLY, KLEMENT, SOLYMOSY e VOROS, 1974) nos quais, entre outras características, o fago exiba taxa de adsorção baixa, período latente exageradamente longo, "burst size" muito pequeno, etc.

6.1.2. Plantas perenes, plantas anuais e o isolamento de fagos

O fato de, neste trabalho, o bacteriófago ter sido isolado somente de plantas fortemente afetadas por Xanthomonas campestris, e não de solo ou sementes, depois de um exame acurado das circunstâncias do experimento aliado a uma cuidadosa revisão de literatura, não deve causar surpresa. O insucesso do isolamento do fago a partir de solo pode ser compreendido considerando-se que o repolho é uma planta de ciclo muito curto. Assim, a possibilidade de queda de folhas atacadas, com conseqüente incorporação da bactéria e de seu fago ao solo, é bastante remota. Remota também é a possibilidade de se encontrar fagos nas sementes de repolho já que, segundo GALLI,

TOKESHI, CARVALHO, BALMER, KIMATI, CARDOSO e SALGADO (1968), a porcentagem de sementes comerciais infectadas com Xanthomonas campestris é de apenas 6 a 8. Daí concluir-se que a porcentagem de ocorrência da bactéria e do fago, juntos, nas sementes, é ainda menor.

Essas prováveis explicações dos motivos pelos quais só se encontraram bacteriófagos nas amostras de tecido de repolho com Xanthomonas campestris são corroboradas, de maneira implícita, por numerosos trabalhos (Tabela 12).

Tabela 12 - Local de isolamento, plantas e bactérias hospedeiras de diversos bacteriófagos

Local de isolamento	Bactéria hospedeira	Planta hospedeira	Referência
<u>Solo</u> *		<u>Perene</u>	
	Agrobacterium radiobacter	alfafa	ROSLYCKY, ALLEN e McCOY (1962)
	Erwinia amylovora	pereira	CROSSE, BENNETT e GARRETT (1958)
	Erwinia amylovora	macieira	BALDWIN JR. e GOODMAN (1963)
	Erwinia amylovora	pereira e macieira	HENDRY, CARPENTER GARRARD (1967)
	Erwinia amylovora	pereira	ERSKINE (1973)
	Erwinia nigrifluens	nogueira	MAGIE e WILSON (1962)
	Erwinia nigrifluens	nogueira	ZEITOUN e WILSON (1969)
	Pseudomonas morsprunorum	cerejeira, damasqueira e ameixeira	CROSSE e HINGORANI (1958)

(continua)

(continuação)

Local de isolamento	Bactéria hospedeira	Planta hospedeira	Referência
<u>Solo</u>		<u>Perene</u>	
	<i>Pseudomonas morsprunorum</i>	cerejeira e ameixeira	CROSSE e GARRETT (1961)
	<i>Pseudomonas morsprunorum</i>	cerejeira e ameixeira	CROSSE e GARRETT (1970)
	<i>Pseudomonas savastanoi</i>	oliveira	WILSON e MAGIE (1962)
	<i>Pseudomonas savastanoi</i>	oliveira	BILLING (1970)
	<i>Pseudomonas syringae</i>	pessegueiro	PERLASCA (1960)
	<i>Pseudomonas syringae</i>	cerejeira	GARRETT, CROSSE e SLETTEN (1974)
	<i>Pseudomonas syringae</i>	pessegueiro	DOWLER e WEAVER (1975)
	<i>Pseudomonas tonelliana</i>	oleandro	WILSON e MAGIE (1962)
	<i>Rhizobium meliloti</i>	alfafa	PARKER e ALLEN (1957)
	<i>Xanthomonas pruni</i>	pessegueiro	ANDERSON (1928)
	<i>Xanthomonas pruni</i>	pessegueiro	CIVEROLO (1970)
		<u>Anual</u>	
	<i>Pseudomonas marginalis</i>	alface	BILLING (1970)
	<i>Xanthomonas phaseoli</i>	feijoeiro	KATZNELSON (1950)
	<i>Xanthomonas phaseoli</i>	feijoeiro	COOK e QUADLING (1959)
<u>Planta Doente</u>		<u>Perene</u>	
	<i>Pseudomonas syringae</i>	pereira	BILLING (1970)
	<i>Pseudomonas syringae</i>	lilás	BILLING (1970)

(continua)

(continuação)

Local	Bactéria hospedeira	Planta hospedeira	Referência
<u>Planta Doente</u>		<u>Anual</u>	
	<i>Corynebacterium flaccumfaciens</i>	feijoeiro	KLEMENT (1957)
	<i>Corynebacterium flaccumfaciens</i>	feijoeiro	KLEMENT e LOVAS (1959)
	<i>Corynebacterium michiganense</i>	tomateiro	ECHANDI e SUN (1973)
	<i>Pseudomonas angulatum</i>	fumo	FULTON (1950)
	<i>Pseudomonas atrofaciens</i>	trigo	SUTTON e KATZNELSON (1953)
	<i>Pseudomonas coronafaciens</i>	aveia	SUTTON e KATZNELSON (1953)
	<i>Pseudomonas glycinea</i>	soja	BILLING (1970)
	<i>Pseudomonas phaseolicola</i>	feijoeiro	BILLING (1970)
	<i>Pseudomonas pisi</i>	ervilha	SUTTON e KATZNELSON (1953)
	<i>Pseudomonas tabaci</i>	fumo	FULTON (1950)
	<i>Pseudomonas tabaci</i>	fumo	BILLING (1970)
	<i>Xanthomonas carotae</i>	cenoura	KLEMENT (1959)
	<i>Xanthomonas malvacearum</i>	algodoeiro	ROSBERG e PARRACK (1955)
	<i>Xanthomonas malvacearum</i>	algodoeiro	HAYWARD (1964)
	<i>Xanthomonas malvacearum</i>	algodoeiro	SINGH, RAO e VERMA (1970)
	<i>Xanthomonas phaseoli f. fuscans</i>	feijoeiro	KLEMENT (1957)
	<i>Xanthomonas phaseoli f. fuscans</i>	feijoeiro	KLEMENT e LOVAS (1959)

(continua)

(continuação)

Local de isolamento	Bactéria hospedeira	Planta hospedeira	Referência
<u>Planta Doente</u>		<u>Anual</u>	
	Xanthomonas translucens	cevada	SUTTON e KATZNELSON (1953)
	Xanthomonas trifolii	trigo	JAMES e ROSLYCKY (1956)
	Xanthomonas vesicatoria	pimentão	KLEMENT (1959)
	Xanthomonas vesicatoria	tomateiro	KLEMENT (1959)

* solo situado sob a planta hospedeira considerada

Do exame da Tabela 12 percebe-se claramente a tendência dos bacteriófagos, cujas bactérias hospedeiras parasitam plantas perenes, serem isolados do solo e, no caso contrário, quando as bactérias hospedeiras parasitam plantas anuais, serem isolados do próprio tecido vegetal doente. Assim é que, da literatura examinada, 19 relatos de isolamento de fagos do solo são pertinentes a plantas perenes e apenas 3 a plantas anuais. E, quando o isolamento deu-se a partir de tecido vegetal doente, apenas 2 relatos referem-se a plantas perenes e, ao contrário, 21 referem-se a plantas anuais (Tabela 12).

A idéia apresentada anteriormente, explicando porque não se conseguiu isolar fagos de Xanthomonas campestris a partir do solo situado sob plantas doentes de repolho, parece, após o exame da Tabela 12, bastante lógica, ainda mais que as 3 exceções que aparecem na Tabela, quando o fago foi isolado do solo e a bactéria hospedeira parasitava planta anual, são facilmente explicáveis. Senão vejamos: o primeiro caso refere-se a Pseudomonas marginalis parasitando alface. É comum plantas hortícolas serem cultivadas in-

tensivamente, ano após ano, no mesmo local. Se isso ocorre, do ponto de vista do isolamento de fagos, a planta hortícola comporta-se como uma planta perene. É possível que esta seja a situação do caso citado (BILLING, 1970). Finalmente os 2 casos envolvendo Xanthomonas phaseoli. A doença causada por essa bactéria em feijoeiro, segundo GALLI, TOKESHI, CARVALHO, BALMER, KIMATI, CARDOSO e SALGADO (1968), provoca o tombamento de plantas em virtude de lesões causadas pelo patógeno na região do primeiro nó do caule da planta. Esse fato, aliado à grande queda de folhas que também acontece, pode explicar a ocorrência de fagos no solo sob as plantas doentes.

Um outro indício do acerto de tais idéias pode ser percebido analisando-se os trabalhos de CROSSE e HINGORANI (1958) e SAMIILENKO e GVOZDYAK (1972). Estes últimos autores tentaram isolar da rizosfera de batata, aveia, beterraba, pepino, ervilha e feijoeiro bacteriófagos que causassem lise em Pseudomonas syringae, Pseudomonas phaseolicola, Pseudomonas pisi ou Pseudomonas glycinea. Apenas 2,5% das amostras coletadas deram resultado positivo em, pelo menos, uma das espécies consideradas. CROSSE e HINGORANI (1958) fizeram um trabalho semelhante, tentando isolar fagos de Pseudomonas morsprunorum de solo situado sob cerejeira, damasqueiro e ameixeira. Conseguiram sucesso em 75% das amostras. Essa grande diferença na porcentagem de amostras que possuíam fago entre um trabalho e outro, 30 vezes maior no de CROSSE e HINGORANI (1958), é devida, provavelmente, ao caráter perene da cerejeira, damasqueiro e ameixeira em oposição ao caráter anual da batata, aveia, beterraba, pepino, ervilha e feijoeiro.

Em resumo, a situação pode ser colocada nos seguintes termos gerais: fagos de uma determinada espécie bacteriana são encontrados, geralmente, onde essa espécie esteja presente. No caso de plantas perenes o solo, sob a planta, é um reservatório de fagos porque também é um reservatório da bactéria em virtude do longo tempo em que ambos, planta e solo, coexistem. Em plantas anuais o tempo de coexistência planta-solo é pequeno e, por consequência, de um modo geral, o solo não será reservatório nem de bactéria e nem de seus fagos.

6.2. PREPARAÇÃO DE ESTOQUE DE FAGO COM ALTO TÍTULO

Os títulos máximos conseguidos com os 2 procedimentos de preparação de estoque de fagos, $6,0 \cdot 10^8$ partículas por ml para o tradicional e $8,5 \cdot 10^{10}$ partículas por ml para o de BERNSTEIN e EISENSTARK (1955), estão plenamente de acordo com os resultados conseguidos por outros autores que trabalharam com fagos de bactéria fitopatogênicas, entre os quais SUTTON, KATZNELSON e QUADLING (1958) que conseguiram $2,5 \cdot 10^9$ partículas por ml com o método tradicional e cerca de $1,0 \cdot 10^{10}$ partículas por ml com um método semelhante ao de BERNSTEIN e EISENSTARK (1955), BILLING (1970) que conseguiu resultados entre 10^9 e 10^{11} partículas por ml trabalhando com diversos fagos de várias espécies de Pseudomonas e os próprios BERNSTEIN e EISENSTARK (1955) que conseguiram pelo sistema tradicional $5,4 \cdot 10^8$ partículas por ml e pelo sistema desenvolvido por eles $1,4 \cdot 10^{11}$ por ml usando 4 fagos diferentes de Xanthomonas pruni.

Se, por qualquer motivo, concentrações iguais ou superiores a 10^{12} partículas por ml forem necessárias será preciso o emprego de métodos mais sofisticados, já que a técnica de BERNSTEIN e EISENSTARK (1955) parece não permitir que se alcance a barreira das 10^{12} partículas por ml. Uma solução para tais casos é usar a técnica da centrifugação diferencial, como fez ERSKINE (1973) que conseguiu $3 \cdot 10^{12}$ partículas por ml.

6.3. CARACTERÍSTICAS GERAIS DO FAGO

6.3.1. Morfologia da placa de lise

A morfologia da placa de lise, resultante da interação fago-bactéria hospedeira, apresentou variação sensível dependendo de qual espécie bacteriana estava servindo de hospedeira para o fago: para Xanthomonas campestris o diâmetro médio foi de 1 a 1,5 mm e para Xanthomonas vesicatoria foi

de 3 mm. Em ambas as situações a placa tinha forma circular e se apresentava absolutamente clara no seu interior.

Os valores encontrados são semelhantes aos já citados na literatura para outros fagos e outras bactérias. O diâmetro mais comum está situado entre 1 e 2 mm como atestam os trabalhos de FULTON (1950) com Pseudomonas tabaci, KLEMENT (1957) com Corynebacterium flaccumfaciens, CROSSE e HINGORANI (1958) com Pseudomonas morsprunorum, ECHANDI e SUN (1973) com Corynebacterium michiganense e ERSKINE (1973) com Erwinia amylovora.

Valores acima de 2 mm já são mais raros e aparecem citados apenas nos trabalhos de KLEMENT (1957) com Xanthomonas phaseoli f. fuscans, PARKER e ALLEN (1957) com Rhizobium meliloti e PERLASCA (1960) com Pseudomonas syringae.

É importante salientar que o diâmetro da placa de lise depende de uma série de fatores (KLECZKOWSKA, 1945a; ANDERSON, 1948; MANDELL e EISENSTARK, 1953) e os dados que aparecem na literatura, citados em trabalhos onde esses fatores não estão perfeitamente caracterizados, talvez não possam ser comparados entre si. KUO, HUANG e YANG (1967) demonstraram, para um fago de Xanthomonas oryzae, que o diâmetro da placa de lise variou com a concentração de bactéria usada (4 mm com $2,5 \cdot 10^{10}$ células por ml e 8 mm com $2,8 \cdot 10^8$ células por ml), com a concentração de ágar do meio semi-sólido (3 mm com 0,6% de ágar e 2 mm com 1,4% de ágar) e com a temperatura de incubação (1,5 mm a 15°C, 3 mm a 35°C e 4 mm a 25°C). Em vista desses fatos, a importância do diâmetro da placa de lise para a caracterização do fago é muito pequena e, atualmente, outras características são empregadas para tal fim como a especificidade (STOLP e STARR, 1964), curva de crescimento (KLEMENT e LOVAS, 1959), curva de inativação frente a vários agentes (CHOW, LIN e KUO, 1971), morfologia da partícula (LWOFF e TOURNIER, 1971), tipo de ácido nucléico (MANASSE e STAPLES, 1971), etc.

6.3.2. Especificidade

6.3.2.1. Métodos de avaliação

A avaliação da especificidade do fago foi feita, como visto em 4.3.2, através de 2 métodos: qualitativo e quantitativo. Este último foi considerado como positivo somente nos casos em que a "efficiency of plating" (EOP) da linhagem bacteriana considerada situou-se acima de 50% em relação à EOP da linhagem de Xanthomonas campestris XCS (WENTWORTH, 1963; STOLP e STARR, 1964). A temperatura na qual os testes foram feitos foi de 28°C já que, como demonstraram SCHWINGHAMER (1966) e CIVEROLO (1974), variações na temperatura afetam drasticamente a EOP.

Os resultados conseguidos neste trabalho, e os de numerosos outros autores (STOLP e STARR, 1964; TAYLOR, 1970 e 1972; ECHANDI e SUN, 1973) indicam que resultados diferentes são conseguidos conforme se usa um ou outro método de avaliação. Essa diversidade de resultados faz surgir a pergunta sobre qual deles é o melhor. STOLP e STARR (1964) acreditam que a superioridade de um sobre o outro depende, essencialmente, do objetivo que se queira alcançar. Como o método qualitativo é menos preciso que o quantitativo (STOLP e STARR, 1964; TAYLOR, 1972; ECHANDI e SUN, 1973) e permite o reconhecimento de espécies que tenham apenas algumas similaridades e não uma quase identidade, como é o caso do quantitativo, ele é empregado pela maioria dos autores (STOLP, 1961; STOLP e STARR, 1964; BILLING, 1970; TAYLOR, 1970 e 1972; ECHANDI e SUN, 1973) para fins de taxonomia bacteriana através de fagos, apesar de opinião contrária de STANIEWSKI (1970). Já o método quantitativo, pela sua grande precisão em caracterizar as espécies diferentes e, em alguns casos, diferenciar lisótipos dentro de uma mesma espécie, é bastante empregado tanto em patologia de sementes (KATZNELSON, 1950; KATZNELSON e SUTTON, 1951) como em estudos epidemiológicos (ANDERSON, 1959; LA-CAZ, FAVA NETTO, FERRI, MENDES e MENDES, 1967; WALLEN e SUTTON, 1965; SUTTON e WALLEN, 1967).

Assim, levando em conta essas opiniões, foram considerados ambos os métodos no estudo sobre a especificidade do fago isolado de Xanthomonas campestris (item 4.3.2) e apenas o quantitativo no estudo referente à patologia de sementes (item 4.4).

6.3.2.2. Aspectos gerais do problema

De todos os autores que encontraram casos nos quais os fagos se comportaram como não específicos, somente STOLP, STARR e BAIGENT (1965) generalizaram o fato, afirmando que "a identificação de bactérias fitopatogênicas, em termos de determinação da espécie, é impossível, tanto para as Xanthomonas quanto para as Pseudomonas, pelo uso de bacteriófagos". Essa afirmação é baseada em 2 exaustivos trabalhos (STOLP, 1961; STOLP e STARR, 1964), um deles realizado com 200 linhagens de Pseudomonas fluorescens, 150 espécies de Pseudomonas fitopatogênicas e 65 diferentes fagos e o outro realizado com 500 linhagens de 80 espécies diferentes de Xanthomonas fitopatogênicas e 12 fagos que, a exemplo dos 65 do trabalho anterior, foram isolados do solo. Em ambos os trabalhos, como já visto em 2.1.2, a conclusão foi pela polivalência dos bacteriófagos usados.

Aceitando-se como correta essa conclusão as consequências serão enormes quanto à importância prática do emprego de fagos em Fitopatologia. Uma delas, apenas para citar uma técnica abordada neste trabalho, seria a invalidação completa do método de detecção de bactérias em sementes por intermédio de fagos, idealizado por KATZNELSON (1950) e KATZNELSON e SUTTON (1951).

No entanto, a conclusão a que chegaram STOLP, STARR e BAIGENT (1965) não resiste a uma análise mais profunda. Como visto poucas linhas atrás, um dos trabalhos que levaram esses autores a tal conclusão foi o de STOLP e STARR (1964), realizado com espécies do gênero Xanthomonas. Os 12 fagos empregados nesse trabalho foram todos isolados de solo cultivado com as

mais variadas plantas, conforme se constata na Tabela 13.

Tabela 13 - Local de isolamento, planta e bactéria hospedeira dos 12 fagos utilizados por STOLP e STARR (1964)

Número do fago	Bactéria hospedeira do fago	Planta hospedeira da bactéria	Solo do qual foi isolado o fago
1	Xanthomonas begoniae	begônia	plantado com trifólio
5	Xanthomonas celebensis	bananeira	solo arado
6	Xanthomonas corylina	aveleira	plantado com girasol
7	Xanthomonas cucurbitae	aboboreira	sementeira de alho
9	Xanthomonas geranii	gerânio	plantado com amendoeira
11	Xanthomonas hyacinthi	jacinto	plantado com ameixeira
15	Xanthomonas malvacearum	algodoeiro	plantado com pessegueiro
17	Xanthomonas oryzae	arroz	plantado com alfafa
20	Xanthomonas phaseoli	feijoeiro	pasto (gramíneas)
22	Xanthomonas phaseoli f. sojense	soja	plantado com ameixeira
25	Xanthomonas ricinicola	mamoneiro	plantado com pessegueiro
219	Pseudomonas rimaefaciens	-	-

Como se vê, o método de isolamento de fagos empregado por STOLP e STARR (1964) é um ótimo método seletivo para o isolamento de fagos polivalentes e, ao mesmo tempo, um péssimo método de isolamento quando o objetivo é saber se eles são específicos ou não. É evidente que um fago isolado de solo plantado com pessegueiros, como é o caso do fago número 15, por exemplo, e detectado com Xanthomonas malvacearum, bactéria esta que não tinha a menor possibilidade de ocorrer naquele solo, só pode ser polivalente. E a situação é absolutamente a mesma com todos os outros bacteriófagos alistados na Tabela 13. Nenhum deles foi isolado de solo que tivesse a possibilidade de abrigar, também, a bactéria usada no seu enriquecimento e detecção. Assim, as conclusões de STOLP, STARR e BAIGENT (1965) são totalmente falsas porque baseadas em pesquisas (STOLP, 1961; STOLP e STARR, 1964) com grave erro conceitual.

Também BILLING (1970) refuta as conclusões de STOLP, STARR e BAIGENT (1965) mas baseada apenas em seus resultados, nos quais a especificidade ficou demonstrada para 3 fagos de diferentes espécies de Pseudomonas isolados de tecido vegetal doente, sem, portanto, chegar ao âmago do problema.

Aliás, a quase sempre polivalência dos fagos isolados do solo, mesmo que a amostra de solo seja coletada sob a planta parasitada pela bactéria em questão, já é conhecida há, pelo menos, 10 anos (HAYWARD, 1964; BILLING, 1970; KIRÁLY, KLEMENT, SOLYMOSY e VOROS, 1974). Isso se deve, provavelmente, à muito menor probabilidade de ocorrência no solo de células da bactéria da qual se quer isolar o fago, em contraste com a planta doente, sempre um bom reservatório do patógeno. As indicações que permitiram chegar a tais conclusões são numerosas (KATZNELSON e SUTTON, 1951; PARKER e ALLEN, 1957; SUTTON, KATZNELSON e QUADLING, 1958; SUTTON e WALLEN, 1967; BILLING, 1970) se bem que há algumas exceções a essa regra e, interessante, todas elas envolvendo plantas perenes, como mostrado na Tabela 14.

Tabela 14 - Plantas e bactérias hospedeiras de diversos bacteriófagos específicos isolados do solo *

Bactéria hospedeira	Planta hospedeira	Referência
<i>Erwinia amylovora</i>	macieira	BALDWIN JR. e GOODMAN (1963)
<i>Erwinia nigrifluens</i>	nogueira	MAGIE e WILSON (1962)
<i>Pseudomonas morsprunorum</i>	cerejeira e ameixeira	CROSSE e GARRETT (1963)
<i>Pseudomonas morsprunorum</i>	cerejeira e ameixeira	GARRETT, CROSSE e SLETTEN (1974)
<i>Pseudomonas savastanoi</i>	oliveira	WILSON e MAGIE (1962)
<i>Pseudomonas syringae</i>	pessegueiro	PERLASCA (1960)

* solo situado sob a planta hospedeira considerada

Essas exceções vêm confirmar, mais uma vez, o acerto das opiniões emitidas no item 6.1.2. Lá foi dito que, neste trabalho, não se conseguiu isolar fago do solo situado sob plantas de repolho em virtude do ciclo muito curto dessa crucífera. A curta duração do ciclo limita bastante a possibilidade de queda de folhas e a conseqüente incorporação da bactéria, Xanthomonas campestris, e de seu fago, ao solo. Já com plantas perenes esse problema não existe. Prova disso é o grande número de fagos isolados do solo sob plantas perenes (Tabela 12) e, em muitos casos, com alta especificidade (Tabela 14), prova inequívoca de que a bactéria fitopatogênica em questão também se encontrava no solo.

6.3.2.3. A especificidade do fago isolado de Xanthomonas campestris

Os resultados do teste qualitativo, apresentados em 5.3.2, dando reação positiva para todos os 6 isolados de Xanthomonas campestris, todos os 4 isolados de Xanthomonas vesicatoria específicos para o pimentão e um dos 5 isolados de Xanthomonas citri indicam a existência de semelhanças entre essas 3 espécies. Essa conclusão é baseada na afirmação de STARR (1959) de que "2 isolados bacterianos lisados pelo mesmo fago devem ser semelhantes, não importando a quais espécies pertençam". Aliás, tais semelhanças entre as espécies consideradas já haviam sido apontadas por DYE (1958) através de inoculações sucessivas em feijoeiro e por STOLP e STARR (1964) através de fagotipagem. Mais recentemente o "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (BUCHANAN e GIBBONS, 1974) considera essas 3 espécies, dentre várias outras, como uma só, denominada Xanthomonas campestris.

O fato de isolados de Xanthomonas campestris, Xanthomonas citri e Xanthomonas vesicatoria, estes últimos patogênicos apenas ao pimentão, serem lisados pelo fago e isolados de Xanthomonas vesicatoria, patogênicos ao tomateiro, não o serem indica que, provavelmente, há maior semelhança entre aquelas 2 espécies e os isolados específicos para pimentão de Xanthomonas vesicatoria do que entre os isolados patogênicos ao pimentão, de um lado, e os isolados patogênicos ao tomateiro, de outro lado, de Xanthomonas vesicatoria. Aliás, a grande variação existente dentro de Xanthomonas vesicatoria já foi considerada suficiente por BURKHOLDER e LI (1941), baseados apenas em características bioquímicas, para que a espécie fosse separada em duas.

A separação das linhagens patogênicas a pimentão e tomateiro, dessa bactéria, por meio de fagos já havia sido feita por KLEMENT (1959) que teve, porém, seus resultados contestados por DYE, STARR e STOLP (1964). O mesmo KLEMENT, agora em parceria com LOVREKOVICH, um ano depois (LOVREKOVICH e

KLEMENT, 1965), voltou a afirmar ser possível a diferenciação dos isolados por fagotipagem, afirmação essa que, a se basear pelo conseguido neste trabalho, está correta. Fato interessante, ainda não descrito na literatura, é que um isolado de Xanthomonas vesicatoria (XV3 - ENA 734), capaz de causar doença tanto em pimentão quanto em tomateiro (ROBBS, 1959), comportou-se, do ponto de vista de sensibilidade ao fago, como os isolados específicos de tomateiro, já que não sofreu lise. A provável ligação entre o gene que controla sensibilidade ao fago e o gene que controla a capacidade de causar doença em tomateiro nesses isolados é um campo interessante que merece pesquisas futuras. Situações semelhantes a essa já foram descritas em Erwinia amylovora (BILLING, 1960) e em Xanthomonas oryzae (GOTO, 1972b).

Os resultados do teste quantitativo, apresentados em 5.3.2, dando reação positiva para os isolados de Xanthomonas campestris XC3, XC5 e XC6, todos coletados em Piracicaba, e negativo para os isolados XC1 e XC2, ambos provenientes do Estado do Rio de Janeiro, mostram a existência de lisótipos geográficos dentro da espécie o que torna Xanthomonas campestris um material experimental de alta valia para estudos epidemiológicos (ANDERSON, 1959; WALLEN e SUTTON, 1965; SUTTON e WALLEN, 1967). O isolado XC4, coletado em Piracicaba e que não apresentou reação positiva no teste quantitativo (EOP entre 10 e 20%), foi demonstrado tornar-se lisogênico em presença do fago. Essa tendência de associações lisogênicas apresentarem diminuição da EOP foi encontrada também por ERSKINE (1973) com a bactéria Erwinia amylovora (EOP de 60%).

Já os isolados de Xanthomonas vesicatoria específicos para pimentão mostraram uma uniformidade digna de nota, pois todos foram sensíveis ao fago no teste quantitativo. Esse fato ganha maior relevância considerando-se que o local de isolamento dos mesmos variou bastante, incluindo Municípios de São Paulo e Rio de Janeiro além do Distrito Federal.

Ao contrário do que aconteceu com Xanthomonas vesicatoria, em Xanthomonas campestris não foi encontrada nenhuma relação entre origem do isolado, se de couve ou repolho, com sensibilidade ao fago o que faz supor não existir nenhuma especialização nesse sentido na bactéria. Esse resultado não causa surpresa já que couve e repolho são apenas variedades de uma mesma espécie.

Finalmente, a se basear na interpretação dada por STOLP e STARR (1964), quanto ao significado dos testes de especificidade, conclui-se que as semelhanças existentes entre Xanthomonas citri de um lado e Xanthomonas campestris e Xanthomonas vesicatoria (isolados patogênicos somente ao pimentão) do outro são bastante superficiais já que somente o teste qualitativo, menos específico, apresentou resultado positivo e, mesmo assim, só para um dos 5 isolados testados.

6.3.3. Inativação térmica

Desde os trabalhos pioneiros de KRUEGER (1932), ADAMS (1949), CHERRY e WATSON (1949) e FOSTER, JOHNSON e MILLER (1949) sobre inativação térmica de bacteriófagos, cujas hospedeiras tinham interesse médico, que esta característica vem sendo bastante empregada para fins de diferenciação entre um fago e outro.

Apenas mais recentemente esta prática foi introduzida entre os fitopatologistas que se dedicam ao estudo de fagos, como o demonstram os trabalhos de PARKER e ALLEN (1957) com fagos de Rhizobium meliloti, KLEMENT e LOVAS (1959) com fago de Corynebacterium flaccumfaciens, KUO, HUANG, WU e YANG (1967) com fagos de Xanthomonas oryzae, ZEITOUN e WILSON (1969) com fagos de Erwinia rubrifaciens, CIVEROLO (1970) com fagos de Xanthomonas pruni, ECHANDI e SUN (1973) com fago de Corynebacterium michiganense e ERSKINE (1973) com fago de Erwinia amylovora.

Os resultados conseguidos neste trabalho, apresentados no item 5.3.3, são similares aos conseguidos com outros fagos por outros autores, no que se refere à faixa de temperatura de inativação, diferindo, porém, em outro aspecto: enquanto que a maioria dos vírus apresenta uma curva de inativação linear (GOODHEART, 1969), quando o logaritmo do número de partículas viáveis é colocado em função do tempo, o presente caso, como pode ser visto na Figura 2, apresentou uma curvatura logo nos primeiros tempos de medição, visível nas temperaturas de 55 e 60 graus centígrados. Essa suave curvatura pode ser explicada pela necessidade de danos cumulativos (2 ou mais) na partícula do fago para que haja a inativação (HIATT, 1964). Logo em seguida a esse abaulamento, a curva volta a ser linear porque, provavelmente, todas as partículas do fago, ou a maioria, já tiveram uma região sua, ou quantas forem necessárias para situá-las no limiar da inativação, alterada pelo calor, bastando mais um dano para que a inativação se concretize (HIATT, 1964; GOODHEART, 1969). O abaulamento da curva é visível a 55 e 60 graus centígrados e não a 65 e 70 graus centígrados porque, provavelmente, nestes 2 últimos casos, os intervalos de leitura, 30 minutos, foram demasiadamente longos.

Um outro fenômeno, bastante comum em fagos de interesse médico (HIATT, 1964), que acarreta o decréscimo da taxa de inativação com o correr do tempo, não foi encontrado para este fago isolado de Xanthomonas campestris. Tal fenômeno, já descrito para um fago de Xanthomonas pruni (CIVEROLO, 1970), é explicado por GARD (1957) que postula uma alteração na permeabilidade da capa protéica do vírus à medida que o tempo de exposição ao calor vai aumentando ("Mechanistic Effect") e, de maneira diferente, por YOUNGNER (1957) que responsabiliza a heterogeneidade inerente das partículas do vírus, com a conseqüente existência de partículas mais resistentes e menos resistentes ao calor, pela mudança de inclinação da curva de inativação ("Vitalistic Effect").

6.3.4. Inativação com ultravioleta e fotorreativação

Atualmente está bem estabelecido que a formação de dímeros de pirimidinas, timina na maioria das vezes, é o mecanismo principal de inativação de vírus pela luz ultravioleta (WULFF, 1963) pois eles bloqueiam a replicação do ácido nucléico do vírus (LURIA e DARNELL JR., 1967). DULBECCO (1949 e 1950), acidentalmente, descobriu que placas com nutriente ágar contendo fagos inativados pela ultravioleta e uma bactéria sensível apresentaram um número de placas de lise muito maior quando mantidas sob luz visível em oposição àquelas mantidas na escuridão. Esse fenômeno já havia sido descrito por KELNER (1949), que trabalhou com Streptomyces griseus, e foi chamado de fotorreativação por DULBECCO (1950). Hoje, sabe-se que a fotorreativação processa-se através de uma enzima fotoativável presente na célula do organismo parasitado e que promove a monomerização dos dímeros de pirimidinas (WULFF e RUPERT, 1962). É por esse motivo que fagos inativados pela ultravioleta só são reativados quando juntos com a célula hospedeira, de nada adiantando submetê-los à luz visível sem a presença da bactéria sensível (DULBECCO, 1950). A enzima responsável pela fotorreativação tem sido objeto de muitos estudos e vem sendo encontrada nos mais diversos organismos como leveduras (RUPERT, 1962), plantas (BAWDEN e KLECZKOWSKI, 1953, 1955 e 1959; WERBIN, HIDALGO-SALVATIERRA, SEER e McLAREN, 1966) e animais (PFEFFERKORN, BURGE e COADY, 1966), além da Escherichia coli na qual os trabalhos foram iniciados (DULBECCO, 1949 e 1950).

Os resultados conseguidos com o fago isolado de Xanthomonas campestris, quando submetido à ultravioleta e fotorreativação, apresentados em 5.3.4, permitem a conclusão de que tanto Xanthomonas campestris como Xanthomonas vesicatoria possuem a enzima fotoativável que promove a monomerização dos dímeros de pirimidinas, já que o número de placas de lise foi sensivelmente maior sob luz visível. Esse fato abre um campo muito interessante de pesquisa e que talvez possa elucidar com maiores detalhes o papel de tal enzima, estudo esse já iniciado, do ponto de vista genético, por HARM e HILLE-

BRANDT (1962) que conseguiram mutantes de Escherichia coli incapazes de promover a fotorreativação. Esses mutantes, aliados à constatação de HAYES (1970) de que Pneumococcus spp, Haemophilus spp e Bacillus subtilis não possuem a enzima e agora sabendo-se que Xanthomonas campestris e Xanthomonas vesicatoria a possuem, com o fato adicional da primeira fotorreativar o fago com uma eficiência maior do que a última (Figuras 3 e 4), demonstrando com isso possuir esse sistema enzimático mais aperfeiçoado, faz desse assunto um palpitante campo para estudos enzimo-genéticos.

Do exame das Figuras 3 e 4 constata-se, também, que tanto a inativação do fago quanto sua fotorreativação, independente de qual bactéria tenha sido usada como hospedeira, seguiu uma cinética de primeira ordem, resultado esse que está de acordo com os dados existentes na literatura (BOWEN, 1953a e b). Contrastando com as diferentes taxas de inativação exibidas pelo fago diante de Xanthomonas campestris e Xanthomonas vesicatoria quando as placas ficaram expostas à luz visível, a inativação do fago com luz ultravioleta, cujas placas foram mantidas no escuro, foi bastante semelhante para ambas as hospedeiras. Comparando-se a intensidade com que se deu a inativação do fago neste trabalho com o único experimento encontrado na literatura (ERSKINE, 1973) no qual técnica semelhante à empregada aqui foi utilizada, envolvendo um fago de bactéria fitopatogênica, Erwinia amylovora, salta à vista o efeito muito mais drástico da ultravioleta encontrado por ERSKINE (1973). Afora as características intrínsecas dos 2 fagos, que podem explicar os resultados diferentes encontrados, também o diluente empregado pode ser responsabilizado por, pelo menos, parte das diferenças encontradas: enquanto que no ensaio de ERSKINE (1973) o diluente não tinha compostos orgânicos em sua composição neste trabalho usou-se como diluente o caldo nutriente, rico em compostos orgânicos. Como se sabe, tais compostos podem reduzir bastante a efetividade da ultravioleta como agente inativador por absorverem grande parte das radiações (LURIA e DARNELL JR., 1967).

6.3.5. Adsorção

As porcentagens de adsorção conseguidas, após 30 minutos da mistura do fago com células bacterianas ter sido feita, 91,5 e 89,6, respectivamente para Xanthomonas campestris e Xanthomonas vesicatoria, podem ser consideradas altamente satisfatórias levando-se em conta outros resultados conseguidos com fagos de bactérias fitopatogênicas, se bem que 30 minutos seja um tempo demasiadamente longo para os fagos empregados em Genética, como os de Escherichia coli, por exemplo, nos quais a adsorção se processa, em média, entre 2 e 15 minutos (KLEMENT e LOVAS, 1959). Mas, mesmo em alguns raros casos envolvendo fagos de patógenos vegetais, resultados como esse podem ser conseguidos, como foi demonstrado por KUO, HUANG e YANG (1967) os quais, trabalhando com um fago de Xanthomonas oryzae, encontraram uma adsorção de 95% levada a efeito em apenas 5 minutos. Mais coerentes com os resultados conseguidos neste trabalho estão as pesquisas de ERSKINE (1973) e GARRETT, CROSSE e SLETTEN (1974). O primeiro, trabalhando com um fago isolado de Erwinia amylovora encontrou uma adsorção de 80 a 95% após 20 minutos e os últimos, com fago de Pseudomonas morsprunorum, encontraram 75 a 98% em 30 minutos. Porém, a grande maioria dos trabalhos apresenta porcentagens de adsorção bem mais baixas que essas citadas até aqui, havendo casos nos quais, mesmo com um alto tempo de adsorção, a porcentagem de fagos adsorvidos não ultrapassa a 40 (CHAPMAN, HILLIER e JOHNSON, 1951; KATZNELSON, SUTTON e BAYLEY, 1954; PARKER e ALLEN, 1957; SUTTON, KATZNELSON e QUADLING, 1958; CIVEROLO, 1974).

Deve-se lembrar ainda que, a exemplo do que acontece com o parâmetro "diâmetro da placa de lise", discutido em 6.3.1, a temperatura e outros fatores podem influenciar drasticamente na eficiência da adsorção, como demonstrado por CIVEROLO (1974). Assim, os trabalhos citados, que nem sempre caracterizam as condições nas quais foram realizados, talvez não possam ser comparados entre si.

6.3.6. Curvas de crescimento

Os valores encontrados para o período latente, período de eclosão e "burst size" do bacteriófago, tanto em Xanthomonas campestris quanto em Xanthomonas vesicatoria, encontram-se descritos em 5.3.6. Comparando-se esses resultados com os conseguidos por numerosos outros autores (Tabela 15), todos trabalhando com fagos de bactérias fitopatogênicas, percebe-se que apenas o valor do período latente do fago, 450 minutos, quando medido em Xanthomonas vesicatoria, foge à norma. Os outros valores, medidos tanto numa hospedeira quanto na outra, não causam surpresa, inclusive não podendo se considerar baixos os "burst size" encontrados, já que em fagos de fitopatógenos, como se vê na Tabela 15, tais valores não são tão altos quanto os encontrados nos fagos de interesse médico e genético (ADAMS, 1959). A grande diferença entre os períodos latentes, conforme a espécie bacteriana empregada como hospedeira, 330 minutos, tem grande significado na viabilidade do controle das doenças causadas por Xanthomonas campestris em repolho e Xanthomonas vesicatoria, em pimentão pelo fago, como será discutido no item 6.5.2.

Tabela 15 - Período latente, período de eclosão e "burst size" de diversos fagos que lisam bactérias fitopatogênicas

Bactéria hospedeira do fago	Período latente (minutos)	Período de eclosão (minutos)	"burst size"	Referência
Agrobacterium tumefaciens	135-150	-	-	MANASSE e STAPLES (1971)
Agrobacterium tumefaciens	135-150	-	64	
	135-150	-	74	
	135-150	-	162	
	150	-	152	MANASSE, STAPLES, GRANADOS e BARNES (1972)

(continua)

(continuação)

Bactéria hospedeira do fago	Período latente (minutos)	Período de eclosão (minutos)	"burst size"	Referência
<i>Corynebacterium flaccumfaciens</i>	80	40	46	KLEMENT e LÓVAS (1959)
<i>Corynebacterium michiganense</i>	180	180	17	ECHANDI e SUN (1973)
<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	211	ERSKINE (1973)
	-	-	124	
<i>Erwinia carotovora</i>	90	-	5-6	CHAPMAN, HILLIER e JOHNSON (1951)
<i>Rhizobium meliloti</i>	80-90	-	80	PARKER e ALLEN (1957)
	170-180	-	317	
<i>Xanthomonas</i> spp	210	60	4	SUTTON, KATZNELSON e QUADLING (1958)
<i>Xanthomonas oryzae</i>	50	-	58	KUO, HUANG, WU e YANG (1967)
<i>Xanthomonas phaseoli</i>	30-45	30	30-40	KATZNELSON, SUTTON e BAYLEY (1954)
<i>Xanthomonas pruni</i>	60-75	120	176-296	CIVEROLO (1970)
	30-45	80	42-49	

6.3.7. Lisogenia

Os 2 ensaios realizados com o objetivo de se comprovar o caráter lisogênico da linhagem XC4 de *Xanthomonas campestris* (item 4.3.7), já que essa linhagem, quando diante do fago, exibiu acentuada redução da EOP além de apresentar placa de lise turva, características estas indicativas de lisogenia (OKABE e GOTO, 1963; LURIA e DARNELL JR., 1967; ERSKINE, 1973), deram

resultado positivo (item 5.3.7). De células da linhagem XC4, isoladas do centro de placas turvas, repicadas 12 vezes consecutivas com o objetivo principal de eliminar possíveis fagos adsorvidos às paredes bacterianas (SUTTON e QUADLING, 1963), fenômeno que LWOFF (1953) chamou de pseudolisogenia, foi possível isolar partículas fágicas em grande quantidade com ou sem indução com ultravioleta. Esta última situação, a presença de fagos mesmo sem indução, demonstra que, provavelmente, o vírus no estado de profago é menos estável, neste caso, do que em numerosos outros descritos na literatura nos quais somente com a indução com mitomicina C (TAKAHASHI e QUADLING, 1961; SUTTON e QUADLING, 1963; CHATTERJEE e GIBBINS, 1971) ou ultravioleta (COETZEE e SACKS, 1959; SUTTON e QUADLING, 1963; LUDEKE, 1972a e b) os profagos se desprendiam do cromossomo bacteriano e lisavam a hospedeira. Pertence a este grupo o único fago temperado descrito, até aqui, para Xanthomonas campestris (SUTTON e QUADLING, 1963). No entanto, situações semelhantes às encontradas neste trabalho nas quais, mesmo sem indução, células lisogênicas podem ser lisadas, além de bastante conhecidas dos estudos pioneiros sobre lisogenia (JACOB e WOLLMAN, 1959b), também já foram descritas por autores que trabalham com bactérias fitopatogênicas (MARSHALL, 1956; BEARDSLEY, 1960; ZIMMERER, HAMILTON e POOTJES, 1966).

Com exceção do gênero Corynebacterium, no qual a ocorrência de linhagens lisogênicas não foi ainda relatada (ECHANDI e SUN, 1973), todos os outros principais gêneros bacterianos de interesse em Fitopatologia já tiveram um ou mais relatos da ocorrência de tal fenômeno como, por exemplo, Agrobacterium (KURKDJIAN, BEARDSLEY e MANIGAULT, 1968; ROUSSAUX, KURKDJIAN e BEARDSLEY 1968), Erwinia (CHATTERJEE e GIBBINS, 1971), Pseudomonas (BAIGENT, DEVAY e STARR, 1963; GARRETT e CROSSE, 1963) e Xanthomonas (EISENSTARK, GOLDBERG e BERNSTEIN, 1955). Essas constatações, aliadas a mais este relato envolvendo Xanthomonas campestris, possibilitam que a análise genética da patogenicidade, em patógenos vegetais, possa ser feita por outros métodos além da conjugação, que já vem sendo empregada em Erwinia amylovora (CHATTERJEE e STARR, 1972 e 1973) e em Pseudomonas syringae, Pseudomonas

glycinea, Pseudomonas phaseolicola, Pseudomonas pisi e Pseudomonas marginalis (LACY e LEARY, 1975; PANOPOULOS, GUIMARAES, CHO e SCHROTH, 1975). Aliás, um bom sistema para o mapeamento de genes relacionados com a patogenicidade através de fagos temperados, nas nossas condições, deve incluir Xanthomonas campestris já que numerosos mutantes auxotróficos (AZEVEDO e MIRANDA FILHO, 1968) e resistentes a antibióticos (AZEVEDO, 1961; AZEVEDO, 1963; AZEVEDO e NEDER, 1963; AZEVEDO e MENEZES, 1966; LEMOS, NEDER e AZEVEDO, 1972; AZEVEDO, 1973) dessa espécie foram estudados entre nós.

6.3.8. Morfologia da partícula

A morfologia da partícula fágica, como se constata pelos resultados apresentados no item 5.3.8, é do tipo espermatozoidal com uma cabeça hexagonal de 42 nm entre as faces paralelas e uma cauda afilada de 88 nm de comprimento por 6 nm de largura. Ornamentando a cauda existe uma bainha, de 32 nm de comprimento por 16 nm de largura quando contraída, fato incomum nos fagos de bactérias fitopatogênicas já que, ao contrário do que acontece com os de interesse médico e genético, não foi encontrado na literatura sobre o assunto relato algum que mencione tal estrutura. Além disso, o comprimento da cauda, 88 nm, também foge à norma como se pode concluir pela Tabela 16.

De posse dessas informações sobre a partícula e com base em duas evidências segundo as quais fagos com capacidade de se tornarem temperados (LURIA e DARNELL JR., 1967) e fagos com morfologia do tipo espermatozoidal (LWOFF e TOURNIER, 1971) têm sempre DNA como material genético, é possível encaixar o fago descrito neste trabalho no sistema LHT de classificação de vírus (LWOFF, HORNE e TOURNIER, 1962; LWOFF e TOURNIER, 1966 e 1971): pertenceria ele, então, à Divisão Deoxyvira por ter DNA como material genético; Classe Deoxybinala por ter simetria complexa; Ordem Urovirales por ter capsídeo nu e Família Phagoviridae por ser esta a única descrita até aqui. Além

disso, este fago, dentro da Família Phagoviridae, pertence ao Grupo A que engloba todos os bacteriófagos possuidores de bainha contrátil (BRADLEY, 1971).

Tabela 16 - Dimensões de alguns fagos de bactérias fitopatogênicas que apresentam morfologia do tipo espermatozoidal

Bactéria hospedeira do fago	Dimensão da cabeça (nm)	Comprimento da cauda *	Referência
Agrobacterium tumefaciens	70	270	MANASSE, STAPLES, GRANADOS e BARNES (1972)
	72	255	
	61	275	
	72	235	
Agrobacterium tumefaciens	110x55	125-135	BOYD, HILDEBRANDT e ALLEN (1970)
Agrobacterium flaccumfaciens	76	240	KLEMENT e LOVAS (1959)
Corynebacterium michiganense	68	245	ECHANDI e SUN (1973)
Erwinia amylovora	60	-	ERSKINE (1973)
Pseudomonas syringae	100	150	PERLASCA (1960)
Xanthomonas oryzae	76x55	133	CHOW, LIN e KUO (1971)
Xanthomonas phaseoli	60	170-190	KATZNELSON, SUTTON e BAYLEY (1954)
Xanthomonas spp	60	180	SUTTON, KATZNELSON e QUADLING (1958)

* caudas sem bainha contrátil

6.4. DETECÇÃO DE XANTHOMONAS CAMPESTRIS EM SEMENTES DE REPOLHO ATRAVÉS DE FAGOS

A enorme facilidade de aplicação, aliada à grande rapidez, da técnica de detecção de patógenos em sementes desenvolvida por KATZNELSON (1950) e KATZNELSON e SUTTON (1951) faz com que ela, onde é possível, seja a técnica preferida dos fitopatologistas que trabalham com sanidade de sementes, ainda mais que resultados altamente confiáveis podem ser conseguidos (WALLEN e SUTTON, 1965). Para o caso específico da Podridão Negra das Crucíferas, causada por Xanthomonas campestris, outros métodos têm sido usados (SHACKLETON, 1962) em virtude de um fago com alta especificidade para essa bactéria não ter sido encontrado até aqui.

Os testes descritos no item 4.4, cujos resultados aparecem em 5.4, representam a primeira tentativa de adaptar a técnica de KATZNELSON (1950) e KATZNELSON e SUTTON (1951) para o caso da doença causada em repolho por Xanthomonas campestris. Fica claro, pelos resultados conseguidos, ser mais importante o tempo de incubação do triturado de sementes do que o tamanho da amostra empregada, já que o patógeno só foi detectado no lote 7 (L7) de sementes quando o tempo de incubação foi igual ou superior a 36 horas, não importando a quantidade de sementes usada. Esse resultado é perfeitamente explicável já que, com um tempo maior de incubação, as eventuais bactérias presentes na amostra terão mais tempo para se multiplicarem e, importante, essa multiplicação se dá exponencialmente enquanto que, com um maior número de sementes, só se consegue um aumento aritmético no número de bactérias presentes. Outra particularidade de valor, e que não é levada em conta por alguns autores (COOK e KATZNELSON, 1960), é que o período de incubação deve se dar na ausência do fago, caso contrário corre-se o risco, se poucas células bacterianas estiverem presentes na amostra, das células serem lisadas de imediato e o aumento do número de fagos na suspensão, por ser muito pequeno, não ser detectado.

Um dos pontos que mais vem recebendo críticas nesse método de detecção de patógenos em sementes é o seu caráter eminentemente qualitativo (TEMPE, 1970; GOTO, 1972a), já que não se pode ter uma idéia do grau de contaminação do lote examinado. Esse problema, no entanto, pode ser facilmente contornado desenvolvendo-se um esquema no qual diversos tratamentos, com diferentes tamanhos de amostra e ou tempos de incubação, sejam montados com os lotes cuja sanidade se quer determinar e lotes com porcentagem conhecida de contaminação. O objetivo deste trabalho não é quantificar o problema, conforme preconizado acima, e sim saber da viabilidade do método no binômio repolho-Xanthomonas campestris mas, mesmo assim, pode-se afirmar, pelos resultados conseguidos, que o lote L4 (semente comercial: Oswaldo Felipe & Filho) tem um grau de contaminação muito semelhante ao L6 (mistura 50% L1 e 50% L2). Bastaria ser L6 um lote padrão, de contaminação conhecida, e o problema da quantificação estaria resolvido, talvez com resultados mais precisos que os conseguidos com outros testes mais demorados e trabalhosos.

Finalmente, considerando-se que o fago empregado neste trabalho mostrou-se ativo contra os 3 isolados de Xanthomonas campestris provenientes de Piracicaba e não contra os 2 originários do Estado do Rio de Janeiro, conclui-se que este método de detecção do patógeno em sementes de repolho, empregando o fago em questão, é viável apenas para a região de Piracicaba, isso na dependência, ainda, de um melhor levantamento dos isolados da bactéria que aqui ocorrem. Para que o método torne-se nacional, por exemplo, além de um levantamento exaustivo dos diversos lisótipos do patógeno que ocorrem no país, seria necessário o emprego de um "pool" de fagos capaz de lisar todos os lisótipos existentes, tarefa que, sem ser difícil, é bastante trabalhosa. Sistemas como esse, empregando "pool" de fagos, foram inicialmente aconselhados por BERNSTEIN e EISENSTARK (1955) e já empregados com sucesso por JAMES e ROSLYCKY (1956) na detecção de Xanthomonas trifolii.

6.5. CONTROLE DAS DOENÇAS CAUSADAS POR XANTHOMONAS CAMPESTRIS EM REPOLHO E XANTHOMONAS VESICATORIA EM PIMENTÃO ATRAVÉS DO FAGO

6.5.1. Modo de ação do fago no controle de Xanthomonas campestris e Xanthomonas vesicatoria

Do exame da Tabela 10 conclui-se que, a exemplo do já constatado por numerosos autores com outras combinações fago-bactéria (STONIER, McSHARRY e SPEITEL, 1967; AGRIOS, 1969; CIVEROLO e KEIL, 1969; BOYD, HILDEBRANDT e ALLEN, 1971; KUO, CHANG, YANG e YANG, 1971; CIVEROLO, 1972 e 1973), o fago empregado neste trabalho não tem, praticamente, nenhuma ação terapêutica, já que houve significância em apenas um tratamento (T+1) em que o patógeno foi inoculado antes do fago e, mesmo assim, apenas quando Xanthomonas campestris foi utilizada. Todos os demais tratamentos que diferiram significativamente do controle (TB), no qual só a bactéria foi pulverizada sobre as plantas, tiveram o fago pulverizado antes do patógeno. CIVEROLO e KEIL (1969) e CIVEROLO (1972), que também encontraram resultados desse tipo, explicam o fato dizendo que as células bacterianas, quando inoculadas antes do fago, ocupam rapidamente os espaços intercelulares do hospedeiro, espaços estes praticamente inacessíveis às partículas fágicas.

Os críticos do controle de doenças bacterianas através de fagos baseiam seus argumentos, principalmente, nessa incapacidade que os fagos têm de alcançar o patógeno após ter este penetrado na célula hospedeira (OKABE e GOTO, 1963). ERSKINE (1973), trabalhando com pereira, Erwinia amylovora e um fago isolado dessa bactéria, postula, visando contornar esse problema, a veiculação do fago junto com uma bactéria não patogênica à planta hospedeira. Aquele autor conseguiu essa associação utilizando um saprófito, frequentemente isolado junto com Erwinia amylovora (FARABEE e LOCKWOOD, 1958; BILLING e BAKER, 1963), que tem a capacidade de se tornar lisogênico em presença do fago em questão. Usando esse método, ERSKINE (1973) conseguiu surpreendentes resultados no controle da "fire blight" da pereira: inocu -

lando só Erwinia amylovora os sintomas apareciam em 2 dias; inoculando o patógeno mais o fago os mesmos sintomas apareciam após 7 dias; inoculando o patógeno mais a bactéria saprófita não lisogênica os sintomas apareciam após 10 dias, isso demonstrando que a bactéria saprófita já tem um efeito inibitório contra o patógeno, fato já descrito por outros autores (GOODMAN, 1967; CHATTERJEE, GIBBINS e CARPENTER, 1969); e, finalmente, quando o patógeno mais a bactéria saprófita lisogênica eram inoculados o retardamento dos sintomas foi de 21 dias. ERSKINE (1973) atribui esse maior retardamento conseguido no último tratamento às características sistêmicas adquiridas pelo fago em virtude de sua associação lisogênica com a bactéria saprófita.

No entanto, deixando-se de lado essa situação excepcional descrita por ERSKINE (1973), é forçoso admitir que o principal modo de ação dos bacteriófagos no controle de doenças, como ilustrado pelos resultados que aparecem na Tabela 10, é mais erradicante que protetor já que o tratamento mais eficiente foi aquele no qual o patógeno e o fago foram pulverizados, sobre as plantas, ao mesmo tempo (T0). Assim, à luz das teorias de VAN DER PLANK (1963), é o inóculo inicial a variável mais afetada na curva de desenvolvimento de doença quando se empregam fagos no controle. Portanto, eles, provavelmente, terão uma eficiência maior no controle de doenças de juro simples e de doenças de juro compostos com baixa taxa de desenvolvimento, em oposição a uma eficiência menor para as doenças de juro compostos com alta taxa de desenvolvimento.

6.5.2. As características de crescimento do fago e a eficiência de controle

O período de tempo que vai desde a infecção da bactéria hospedeira pelo fago até sua lise completa foi de 210 minutos para Xanthomonas campestris e 570 minutos para Xanthomonas vesicatoria. Com base nesses valores fica fácil entender porque o controle de Xanthomonas campestris em repolho foi

muito mais eficiente do que o controle de Xanthomonas vesicatoria em pimentão, conforme se constata nas Tabelas 10 e Figura 9. Provavelmente, o tempo que demora o fago para lisar Xanthomonas vesicatoria é suficiente para que o patógeno se aloje nos espaços intercelulares do hospedeiro os quais, conforme proposto por CIVEROLO e KEIL (1969) e CIVEROLO (1972), são inacessíveis às partículas do fago.

Essa correlação entre o tempo necessário para a lise da célula e a eficiência do controle já havia sido notada por CIVEROLO (1970), em trabalho com Xanthomonas pruni, no qual 2 diferentes fagos foram usados, um de cada vez, contra uma única linhagem bacteriana. O fago que necessitou menor tempo para lisar a hospedeira, 130 minutos a menos, apesar de ter um "burst size" inferior, 191 partículas a menos, possibilitou uma redução do nível de doença da ordem de 61% em oposição a uma redução de apenas 46% conseguida com o outro fago.

Os 2 trabalhos citados, realizados em condições diferentes, o de CIVEROLO (1970) empregando 2 fagos e uma espécie bacteriana e este empregando um fago e duas espécies bacterianas, mostram ser menos importante o "burst size" que o tempo necessário para a célula do patógeno sofrer lise (período latente + período de eclosão). Em ambos os trabalhos as combinações que requereram menos tempo para serem lisadas apresentaram menor quantidade de doença, não obstante apresentarem, coincidentemente, maiores "burst size".

6.5.3. Linhagens bacterianas resistentes aos fagos e a eficácia do controle

Outro ponto no qual os críticos do controle de doenças bacterianas através de fagos se baseiam, além do já discutido no item 6.5.1, é a grande facilidade com que mutantes resistentes aos fagos aparecem (FULTON, 1950; OKABE e GOTO, 1963; CIVEROLO, 1972). Isso, segundo eles, diminuiria em muito

a viabilidade prática do emprego de fagos no controle de doenças. No entanto, segundo ADAMS (1959), a frequência com que aparecem mutantes resistentes aos fagos em nada difere da frequência de mutações para resistência a drogas, os antibióticos principalmente. E, a exemplo do que acontece com os mutantes resistentes aos antibióticos que, via de regra, têm suas taxas de crescimento bastante reduzidas (RANGASWAMI, 1957; AZEVEDO e NEDER, 1963; BERGAMIN FILHO, 1973), fato que aumenta a eficiência do controle, também os mutantes resistentes aos fagos apresentam tal alteração, além de terem suas agressividades bastante atenuadas. Assim é que CROSSE e GARRETT (1970), trabalhando com Pseudomonas morsprunorum, constataram a completa perda de agressividade de um isolado resistente ao fago A7; GOTO (1972b) relata a marcante atenuação da agressividade que acompanhou o caráter resistência ao fago Bpl num isolado de Xanthomonas oryzae; ERSKINE (1973) constatou o mesmo fenômeno com Erwinia amylovora e o fago S1; finalmente, GARRETT, CROSSE e SLETTEN (1974), trabalhando com Pseudomonas morsprunorum, completando a pesquisa de CROSSE e GARRETT (1970), constataram a atenuação da agressividade em isolados do patógeno resistentes aos fagos A15 e S6.

Em vista desses fatos parece ser possível estender, aos fagos, o conceito desenvolvido por BERGAMIN FILHO (1973) e BERGAMIN FILHO, KIMATI e AZEVEDO (1975) a respeito de força de drogas. Assim, à semelhança das drogas, pode-se falar em fagos fortes, fagos fracos e fagos neutros. Os fagos fortes caracterizam-se por induzirem uma diminuição na taxa de crescimento ou uma perda de agressividade nas linhagens bacterianas mutantes resistentes. As evidências mostram que a maioria dos fagos, à semelhança do que acontece com as drogas, comporta-se dessa maneira (CROSSE e GARRETT, 1970; GOTO, 1972b; ERSKINE, 1973; GARRETT, CROSSE e SLETTEN, 1974). Os fagos fracos caracterizam-se por induzirem um aumento na taxa de crescimento ou um ganho de agressividade nas linhagens bacterianas mutantes resistentes. Não foi encontrado na literatura nenhum relato que se ajuste a esta situação. Finalmente, os fagos neutros caracterizam-se por não alterarem nem a taxa de crescimento e nem a agressividade das linhagens bacterianas mutantes resis-

tentes. FULTON (1950), trabalhando com Pseudomonas tabaci, descreveu uma situação na qual esse fenômeno ocorre.

Todas essas considerações levam à conclusão de que as possibilidades do emprego com sucesso dos fagos no controle de doenças bacterianas em plantas ou animais são praticamente as mesmas, do ponto de vista do desenvolvimento de resistência por parte do patógeno, daquelas apresentadas pelas drogas de qualquer natureza.

Pelos dados apresentados percebe-se que a situação dos mutantes resistentes aos fagos, na ausência dos fagos, não é, de um modo geral, nada favorável (CROSSE e GARRETT, 1970; GOTO, 1972b; ERSKINE, 1973; GARRETT, CROSSE e SLETTEN, 1974). Em vista disso seria interessante especular, como feito para o caso de drogas e fatores R (BERGAMIN FILHO, 1973; BERGAMIN FILHO, KIMATI e AZEVEDO, 1975), se a lisogenia não foi o caminho encontrado pelas bactérias para fugir da quase inevitável perda de agressividade e capacidade de sobrevivência que acompanha a resistência aos fagos pois, neste caso, as bactérias ganham a resistência e não perdem aqueles outros genes que, sem dúvida, perderiam caso a resistência fosse devida a genes de seu próprio genoma. Evidências de que bactérias lisogênicas não são menos aptas em sobreviver e nem perdem agressividade são apresentadas por MARSHALL (1956) que trabalhou com Rhizobium trifolii e LUDEKE (1972b) que trabalhou com Pseudomonas morsprunorum, respectivamente.

7. CONCLUSÕES

7.1. SOBRE O ISOLAMENTO E DETECÇÃO DO FAGO

a) O clorofórmio pode ser usado diante do fago isolado neste trabalho, quando a esterilização for requerida, já que não inativa suas partículas;
b) a prática do enriquecimento simples mostrou ser obrigatória no isolamento do fago.

7.2. SOBRE A OBTENÇÃO DE ESTOQUE DE FAGO COM ALTO TÍTULO

As técnicas usuais de obtenção de estoque de fagos com alto título não permitem, para este caso, que se consiga uma concentração maior do que 10^{10} partículas por ml.

7.3. SOBRE AS CARACTERÍSTICAS GERAIS DO FAGO

Os resultados dos ensaios sobre especificidade permitem as seguintes conclusões: a) há maior semelhança entre Xanthomonas campestris, Xanthomonas citri e os isolados específicos para pimentão de Xanthomonas vesicatoria do que entre estes últimos e os isolados patogênicos ao tomateiro de Xanthomonas vesicatoria; b) a diferenciação entre os isolados de Xanthomonas vesicatoria patogênicos ao pimentão de um lado e os isolados patogênicos ao tomateiro e tomateiro-pimentão de outro lado pode ser feita por fago tipagem através do fago isolado neste trabalho; c) a existência de lisótipos geográficos entre os isolados de Xanthomonas campestris mostra ser essa espécie de grande valor para estudos epidemiológicos.

Os resultados dos ensaios sobre inativação com ultravioleta e fotorreativação do fago permitem a seguinte conclusão: o sistema enzimático fotoa-

tivável que promove a monomerização dos dímeros de pirimidinas está presente tanto em Xanthomonas campestris como em Xanthomonas vesicatoria.

Os resultados dos ensaios sobre lisogenia com um isolado de Xanthomonas campestris e o fago permitem a seguinte conclusão: o isolado XC4 tornou-se lisogênico diante do fago o que mostra ser esse sistema um material experimental de alto valor para estudos sobre genética da patogenicidade.

Os resultados dos exames do fago ao microscópio eletrônico permitem as seguintes conclusões: a) o fago possui cauda contrátil; b) o fago pertence ao grupo A de BRADLEY (1971).

7.4. SOBRE A DETECÇÃO DE XANTHOMONAS CAMPESTRIS EM SEMENTES DE REPOLHO ATRAVÉS DO FAGO

a) O método é viável; b) um tempo mínimo de incubação do triturado de sementes de 36 horas é aconselhável quando se quer determinar a sanidade de sementes de repolho com o fago isolado neste trabalho; c) para que o método funcione em âmbito mais amplo que o regional (os isolados do patógeno obtidos na região de Piracicaba mostraram-se sensíveis ao fago mas os isolados de outras regiões mostraram-se resistentes) é necessário o uso de um "pool" de fagos capaz de lisar todos ou a grande maioria dos lisótipos do patógeno existentes na nova área considerada.

7.5. SOBRE O CONTROLE DAS DOENÇAS CAUSADAS POR XANTHOMONAS CAMPESTRIS EM REPOLHO E XANTHOMONAS VESICATORIA EM PIMENTÃO ATRAVÉS DO FAGO

a) O método é eficiente, pelo menos em condições de casa de vegetação ;
b) o fago, no controle de ambas as bactérias, mostrou ter efeito mais erradicante que protetor além de apresentar um quase nulo efeito terapêutico ;
c) a maior eficiência conseguida no controle de Xanthomonas campestris, em

comparação com a conseguida para Xanthomonas vesicatoria, está relacionada com os diferentes tempos necessários para que a lise ocorra nas duas espécies, 360 minutos a mais em Xanthomonas vesicatoria.

8. RESUMO

De tecido de repolho fortemente atacado com Xanthomonas campestris, foi isolado um fago que se mostrou ativo, no teste quantitativo, frente a Xanthomonas campestris e Xanthomonas vesicatoria. O fago, que tem cabeça hexagonal simétrica com 42 nm entre as arestas paralelas, bainha de 32 nm, quando contraída, cauda de 88 nm e comprimento total de 130 nm, apresentou as seguintes características.

8.1. COM XANTHOMONAS CAMPESTRIS COMO HOSPEDEIRA: a) Após 18 horas de incubação a 28°C forma placas de lise claras, circulares e com diâmetro de 1-1,5 mm; b) é inativado totalmente quando exposto a 65°C por 180 minutos e a 70°C por 60 minutos; c) é inativado totalmente quando exposto à luz ultravioleta por 55 minutos com incubação no escuro e por 65 minutos com incubação no claro; d) após 30 minutos em presença da célula hospedeira 91,5% das partículas já se adsorveram; e) o período latente dura 120 minutos, o de eclosão 90 minutos e o "burst size" é de 33 partículas; f) torna-se temperado em presença de um dos isolados da hospedeira (XC4); g) pode ser usado com sucesso na detecção de Xanthomonas campestris em sementes de repolho; h) pode ser usado com sucesso, pelo menos em condições de casa de vegetação, no controle da doença causada em repolho por Xanthomonas campestris. No tratamento mais eficiente, quando o fago e a bactéria foram inoculados juntos, reduziu em 99,83% a quantidade de doença.

8.2. COM XANTHOMONAS VESICATORIA COMO HOSPEDEIRA: a) após 18 horas de incubação a 28°C forma placas de lise claras, circulares e com diâmetro de 3 mm; b) é inativado totalmente quando exposto à luz ultravioleta por 55 minutos com incubação no escuro e por 60 minutos com incubação no claro; c) após 30 minutos em presença da célula hospedeira 89,6% das partículas já se adsorveram; d) o período latente dura 450 minutos, o de eclosão 120 minutos e o "burst size" é de 48 partículas; e) pode ser usado com sucesso, pelo menos em condições de casa de vegetação, no controle da doença causada em pimentão por Xanthomonas vesicatoria. No tratamento mais eficiente, quando o fago e a bactéria foram inoculados juntos, reduziu em 95,02% a quantidade de doença.

9. SUMMARY

A phage was isolated from cabbage tissue with severe symptoms caused by Xanthomonas campestris. Activity of the phage was demonstrated in a quantitative test against Xanthomonas campestris and Xanthomonas vesicatoria. The phage has a hexagonal symmetrical head with 42 nm between the parallel edges, a contractable sheath of 32 nm, tail of 88 nm and length of 130 nm. Following are the characteristics.

9.1. WITH XANTHOMONAS CAMPESTRIS AS HOST: a) After 18 hours incubation at 28°C clear plaques are formed that are circular with diameter of 1-1,5 mm; b) it is inactivated when exposed at 65°C for 180 minutes and at 70°C for 60 minutes; c) it is inactivated when exposed to ultraviolet light for 55 minutes incubated in darkness and for 65 minutes incubated in light; d) after 30 minutes in the host cell 91,5% of the particles were adsorbed; e) the latent period duration is 120 minutes, the rise period is 90 minutes and the burst size is 33 particles; f) it becomes temperate in the presence in one of the host isolates (XC4); g) can be used successfully in detection of Xanthomonas campestris in cabbage seeds; h) can be used successfully at least under greenhouse conditions, in the control of the cabbage disease caused by Xanthomonas campestris. The most efficient treatment was inoculation with the phage and bacteria simultaneously which reduced the symptoms by 99,83%.

9.2. WITH XANTHOMONAS VESICATORIA AS HOST: a) after 18 hours incubation at 28°C clear plaques are formed that are circular with diameter of 3 mm; b) it is inactivated when exposed to ultraviolet light for 55 minutes incubated in darkness and for 60 minutes incubated in light; c) after 30 minutes in the host cell 89,6% of the particles were adsorbed; d) the latent period duration is 450 minutes, the rise period is 120 minutes and the burst size is 48 particles; e) can be used successfully at least under greenhouse conditions, in the control of the pepper disease caused by Xanthomonas vesicatoria. The most efficient treatment was inoculation with the phage and bacteria simultaneously which reduced the symptoms by 95,02%.

10. LITERATURA CITADA

- ADAMS, M.H. (1949). The stability of bacterial viruses in solutions of salts. *J. Gen. Physiol.* 32:579-585.
- ADAMS, M.H. (1959). *Bacteriophages*. Interscience Publishers, New York. 592 pp.
- AGRIOS, G.N. (1969). *Plant Pathology*. Academic Press, New York. 629 pp.
- ANDERSON, E.S. (1959). Use of phages in epidemiological studies. In ADAMS, M.H. (Ed.). *Bacteriophages*. Interscience Publishers, New York. 592 pp.
- ANDERSON, H.W. (1928). Bacteriophages of Bacterium pruni. *Phytopathol.* 18:144.
- ANDERSON, T.F. (1948). The influence of temperature and nutrients on plaque formation by bacteriophages active on Escherichia coli strain B. *J. Bacteriol.* 55:659-665.
- AZEVEDO, J.L. (1961). Resistência e mutação de Xanthomonas campestris (Pammel) Dowson, em relação a alguns antibióticos. Tese de Doutorado, ESALQ, Piracicaba, 48 pp.
- AZEVEDO, J.L. (1963). Mutantes resistentes a antibióticos em Xanthomonas campestris (Pammel) Dowson. *Anais E.S.A. "Luiz de Queiroz"* 20:150-160.
- AZEVEDO, J.L. (1973). Resistência aos antibióticos em bactérias fitopatogênicas. *Ciência e Cultura* 25:326-329.
- AZEVEDO, J.L. e MENEZES, T.J.B. (1966). Resistência de Xanthomonas campestris com relação à tilosina e vancomicina. *Anais E.S.A. "Luiz de Queiroz"* 23:188-194.
- AZEVEDO, J.L. e MIRANDA FILHO, J.B. (1968). Crescimento de linhagens selvagens e mutantes de Xanthomonas campestris em diferentes meios de cultura. *Boletim Informativo da Associação Paulista de Medicina (Piracicaba)* 10:1-11.
- AZEVEDO, J.L. e NEDER, R.N. (1963). Comparação entre o crescimento de linhagens mutantes resistentes a antibióticos, e linhagens não mutantes de Xanthomonas campestris (Pammel) Dowson. *Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz"* 20:164-176.

- BOWEN, G.H. (1953a). Studies of ultraviolet irradiation phenomena - An approach to the problems of bacteriophage reproduction. Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol. 18:245-253.
- BOWEN, G.H. (1953b). Kinetic studies on the mechanism of photoreactivation of bacteriophage T2 inactivated by ultraviolet light. Ann. Inst. Pasteur 84:218-221.
- BOYD, R.J.; HILDEBRANDT, A.C. e ALLEN, O.N. (1970). Electron microscopy of phage for Agrobacterium tumefaciens. Arch. Mikrobiol. 73:47-54.
- BOYD, R.J.; HILDEBRANDT, A.C. e ALLEN, O.N. (1971). Retardation of crown gall enlargement after bacteriophage treatment. Plant Disease Reporter 55:145-148.
- BRADLEY, D.E. (1971). A comparative study of the structure and biological properties of bacteriophages. In MARAMOROSCH, K. e KURSTAK, E. (Ed.) Comparative Virology. Academic Press, New York. 584 pp.
- BROWN, N.A. e QUIRK, A.J. (1929). Influence of bacteriophage on Bacterium tumefaciens, and some potential studies of filtrates. Journal Agricultural Research 39:503-530.
- BRUCH, C.W. e ALLEN, O.N. (1957). Host specificities of four Lotus rhizobionphages. Can. J. Microbiol. 3:181-189.
- BUCHANAN, R.E. e GIBBONS, N.E. (Ed.) (1974). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The Williams & Wilkins Company, Baltimore. 1268 pp.
- BURKHOLDER, W.H. e LI, C.C. (1941). Variations in Phytomonas vesicatoria. Phytopathol. 31:753-755.
- CHAPMAN, G.; HILLIER, J. e JOHNSON, F.H. (1951). Observations on the bacteriophagy of Erwinia carotovora. J. Bacteriol. 61:261-268.
- CHATTERJEE, A.K. e GIBBINS, L.N. (1971). Induction of nonpigmented variants of Erwinia herbicola by incubation at supraoptimal temperatures. J. Bacteriol. 106:107-112.
- CHATTERJEE, A.K.; GIBBINS, L.N. e CARPENTER, J.A. (1969). Some observations on the physiology of Erwinia herbicola and its possible implication as a factor antagonistic to Erwinia amylovora in the "fire blight" syndrome. Can. J. Microbiol. 15:640-642.

- CHATTERJEE, A.K. e STARR, M.P. (1972). Genetic transfer of episomic elements among Erwinia species and other Enterobacteria: F⁺lac⁺. J. Bacteriol. 111:169-176.
- CHATTERJEE, A.K. e STARR, M.P. (1973). Gene transmission among strains of Erwinia amylovora. J. Bacteriol. 116:1100-1106.
- CHERRY, W.B. e WATSON, D.W. (1949). The Streptococcus lactis host-virus system. I. Factors influencing quantitative measurement of the virus. J. Bacteriol. 58:601-610.
- CHOW, T.; LIN, Y. e KUO, T. (1971). Stability of phage Xpl2. Bot. Bull. of Academia Sinica. 12:57-65.
- CIVEROLO, E.L. (1970). Comparative relationships between two Xanthomonas pruni bacteriophages and their bacterial host. Phytopathol. 60:1385-1388.
- CIVEROLO, E.L. (1972). Interaction between bacteria and bacteriophages on plant surfaces and in plant tissues. Proc. Third Int. Conf. Plant Pathogenic Bacteria (Wageningen). Pág. 25-37.
- CIVEROLO, E.L. (1973). Relationships of Xanthomonas pruni bacteriophages to bacterial spot disease in Prunus. Phytopathol. 63:1279-1284.
- CIVEROLO, E.L. (1974). Temperature effects on the relationships between Xanthomonas pruni and its virulent phages. Phytopathol. 64:1248-1255.
- CIVEROLO, E.L. e KEIL, H.L. (1969). Inhibition of bacterial spot of peach foliage by Xanthomonas pruni bacteriophage. Phytopathol. 59:1966-1967.
- COETZEE, J.N. e SACKS, T.G. (1959). Lysogeny in the genus Proteus. Nature 184:1340.
- CONN, H.J.; BOTTCHEER, E.J. e RANDALL, C. (1945). The value of bacteriophage in classifying certain soil bacteria. J. Bacteriol. 49:359-373.
- COOK, F.D. e KATZNELSON, H. (1960). Isolation of bacteriophages for the detection of Corynebacterium insidiosum, agent of bacterial wilt of alfafa. Can. J. Microbiol. 6:121-125.
- COOK, F.D. e QUADLING, C. (1959). A modified technique for isolation of bacteriophage from contaminated materials. Can. J. Microbiol. 5:311-312.

- COONS, G.H. e KOTILA, J.E. (1925). The transmissible lytic principle (bacteriophage) in relation to plant pathogens. *Phytopathol.* 7:357-370.
- COSTA, A.S. (1975). Avaliação das perdas causadas pelas fitoviroses. Apostila, ESALQ, Piracicaba, 12 pp.
- CROSSE, J.E.; BENNETT, M. e GARRETT, C.M.E. (1958). Fire-blight of pear in England. *Nature* 182:1530.
- CROSSE, J.E. e GARRETT, C.M.E. (1961). Relationship between phage type and host plant in Pseudomonas morsprunorum Wormald. *Nature* 192:379-380.
- CROSSE, J.E. e GARRETT, C.M.E. (1963). Studies on the bacteriophagy of Pseudomonas morsprunorum, Pseudomonas syringae and related organisms. *J. Appl. Bact.* 26:159-177.
- CROSSE, J.E. e GARRETT, C.M.E. (1966). Bacterial canker of stone-fruits. VII. Infection experiments with Pseudomonas morsprunorum e Pseudomonas syringae. *Ann. Appl. Biol.* 58:31-41.
- CROSSE, J.E. e GARRETT, C.M.E. (1970). Pathogenicity of Pseudomonas morsprunorum in relation to host specificity. *J. Gen. Microbiol.* 62:315-327.
- CROSSE, J.E. e HINGORANI, M.K. (1958). A method for isolating Pseudomonas morsprunorum phages from the soil. *Nature* 181:60-61.
- DEMOLON, A. e DUNEZ, A. (1932). Bactériophage et fatigue des sols cultivés en lucerne. *Arch. Microbiol.* 3:139-140.
- DEMOLON, A. e DUNEZ, A. (1935). Recherches sur le rôle du bactériophage dans la fatigue des lucerniers. *Ann. Agron. (France)* 5:89-111.
- DOWLER, W.M. e WEAVER, D.J. (1975). Isolation and characterization of fluorescent pseudomonads from apparently healthy peach trees. *Phytopathol.* 65:233-236.
- DULBECCO, R. (1949). Reactivation of ultraviolet-inactivated bacteriophage by visible light. *Nature* 163:949-950.
- DULBECCO, R. (1950). Experiments on photoreactivation of bacteriophages inactivate with ultraviolet radiation. *J. Bacteriol.* 59:329-347.
- DYE, D.W. (1958). Host specificity in Xanthomonas. *Nature* 182:1813-1814.

- DYE, D.W.; STARR, M.P. e STOLP, H. (1964). Taxonomic clarification of Xanthomonas vesicatoria based upon host specificity, bacteriophage sensitivity, and cultural characteristic. *Phytopathol. Z.* 51:394-407.
- ECHANDI, E. e SUN, M. (1973). Isolation and characterization of a bacteriophage for the identification of Corynebacterium michiganense. *Phytopathol.* 63:1398-1401.
- EISENSTARK, A. e BERNSTEIN, L.B. (1955). Specificity of bacteriophages of Xanthomonas pruni. *Phytopathol.* 45:596-598.
- EISENSTARK, A.; GOLDBERG, S.S. e BERNSTEIN, L.B. (1955). Lisogenicity in Xanthomonas pruni. *J. Gen. Microbiol.* 12:402-405.
- EISENSTARK, A. e THORNBERRY, H.H. (1950). Plaque formation by Xanthomonas pruni bacteriophage. *Phytopathol.* 40:876-877.
- ELLIS, E.L. e DELBRUCK, M. (1939). The growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* 22:365-384.
- ERSKINE, J.M. (1973). Characteristics of Erwinia amylovora bacteriophage and its possible role in the epidemiology of fire blight. *Can. J. Microbiol.* 19:837-845.
- FARABEE, G.J. e LOCKWOOD, J.L. (1958). Inhibition of Erwinia amylovora by Bacterium sp. isolated from fire blight cankers. *Phytopathol.* 48:209-211.
- FOSTER, R.A.C.; JOHNSON, F.H. e MILLER, V.K. (1949). The influence of hydrostatic pressure and urethane on the thermal inactivation of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* 33:1-13.
- FULTON, R.W. (1950). Bacteriophages attacking Pseudomonas tabaci and Pseudomonas angulatum. *Phytopathol.* 40:936-949.
- GALLI, F.; TOKESHI, H.; CARVALHO, P.C.T.; BALMER, E.; KIMATI, H.; CARDOSO, C.O.N. e SALGADO, C.L. (1968). *Manual de Fitopatologia. Doenças das Plantas e seu Controle.* Editora Agronômica CERES, S. Paulo. 640 pp.
- GARD, S. (1957). Chemical inactivation of viruses. *Ciba Found. Symp. Nature Viruses.* Pág. 123-146.
- GARRETT, C.M.E. e CROSSE, J.E. (1963). Observations on lysogeny in the plant pathogens Pseudomonas morsprunorum and Pseudomonas syringae. *J. Appl. Bact.* 26:27-34.

- GARRETT, C.M.E.; CROSSE, J.E. e SLETTEN, A. (1974). Relation between phage sensitivity and virulence in Pseudomonas morsprunorum. J.Gen. Microbiol. 80:475-483.
- GOODHEART, C.R. (1969). An Introduction to Virology. W.B. Saunders Company, Philadelphia. 432 pp.
- GOODMAN, R.N. (1965). In vitro and in vivo interactions between components of mixed bacterial cultures isolate from apple buds. Phytopathol. 55: 217-221.
- GOODMAN, R.N. (1967). Protection of apple stem tissue against Erwinia amylovora infection by avirulent strains and three other bacterial species. Phytopathol. 57:22-24.
- GOTO, M. (1972a). The significance of the vegetation for the survival of plant pathogenic bacteria. Proc. Third Int. Conf. Plant Pathogenic Bacteria (Wageningen). Pág. 39-53.
- GOTO, M. (1972b). Interrelationship between colony types, phage susceptibility and virulence in Xanthomonas oryzae. J. Appl. Bact. 35:505-515.
- HARM, W. e HILLEBRANDT, B. (1962). A non-photoreactivable mutant of Escherichia coli B. Photoch. and Photobiol. 1:271-272.
- HAYES, W. (1970). The genetics of bacteria and their viruses. Studies in basic genetics and molecular biology. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 925 pp.
- HAYWARD, A.C. (1964). Bacteriophage sensitivity and biochemical group in Xanthomonas malvacearum. J. Gen. Microbiol. 35:287-298.
- HENDRY, A.T.; CARPENTER, J.A. e GARRARD, E.H. (1967). Bacteriophage studies of isolates from fire blight sources. Can. J. Microbiol. 13:1357-1364.
- HIATT, C.W. (1964). Kinetics of the inactivation of viruses. Bacteriol. Rev. 28:150-163.
- JACOB, F. e WOLLMAN, E.L. (1959a). Lysogeny. In ADAMS, M.H. (Ed.). Bacteriophages. Interscience Publishers, New York. 592 pp.
- JACOB, F. e WOLLMAN, E.L. (1959b). Lysogeny. In BURNET, F.M. e STANLEY, W.M. (Eds.). The Viruses, Vol. 2. Academic Press, New York. 408 pp.

- JAMES, N. e ROSLYCKY, E.B. (1956). Specificity of bacterial virus for Xanthomonas trifolii. Can. J. Microbiol. 2:6-11.
- KATZNELSON, H. (1950). The detection of internally-borne bacterial pathogens of beans by a rapid phage-plaque count technique. Science 112: 645-647.
- KATZNELSON, H. e SUTTON, M.D. (1951). A rapid phage plaque count method for the detection of bacteria as applied to the demonstration of internally borne bacterial infections of seed. J. Bacteriol. 61:689-701.
- KATZNELSON, H. e SUTTON, M.D. (1953). Bacteriophage in relation to Xanthomonas translucens. Can. J. Botany 31:725-729.
- KATZNELSON, H.; SUTTON, M.D. e BAYLEY, S.T. (1954). The use of bacteriophage of Xanthomonas phaseoli in detecting infection in beans, with observations on its growth and morphology. Can. J. Microbiol. 1:22-29.
- KATZNELSON, H. e WILSON, J.K. (1941). Occurrence of Rhizobium meliloti bacteriophage in soils. Soil Sci. 51:59-63.
- KAUFFMAN, H.E. e REDDY, A.P.K. (1975). Seed transmission studies of Xanthomonas oryzae in rice. Phytopathol. 65:663-666.
- KENT, G.C. (1937). Some physical, chemical, and biological properties of a specific bacteriophage of Pseudomonas tumefaciens. Phytopathol. 27: 871-902.
- KEIL, H.L. e WILSON, R.A. (1963). Control of peach bacterial spot with Xanthomonas pruni bacteriophage. Phytopathol. 53:746-747.
- KELNER, A. (1949). Effect of visible light on the recovery of Streptomyces griseus conidia from ultra-violet irradiation injury. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 35:73-79.
- KIRÁLY, Z.; KLEMENT, Z.; SOLYMOSY, F. e VOROS, J. (1974). Methods in plant pathology. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam. 509 pp.
- KLECZKOWSKA, J. (1945a). The production of plaques by Rhizobium bacteriophage in poured plates and its value as a counting method. J. Bacteriol. 50:71-79.
- KLECZKOWSKA, J. (1945b). A quantitative study of the interaction of bacteriophage with Rhizobium using the technique of plates. J. Bacteriol. 50:81-94.

- KLECZKOWSKA, J. (1957). A study of the distribution and the effects of bacteriophage of root nodule bacteria in the soil. *Can. J. Microbiol.* 3:171-180.
- KLEMENT, Z. (1957). Two new bacteriophages for bacterial pathogens of the bean. *Nature* 180:41-42.
- KLEMENT, Z. (1959). Some new specific bacteriophages for plant pathogenic Xanthomonas spp. *Nature* 184:1248-1249.
- KLEMENT, Z. e LOVAS, B. (1959). Isolation and characterization of a bacteriophage for Corynebacterium flaccumfaciens. *Phytopathol.* 49:107-112.
- KLEMENT, Z. e LOVREKOVICH, L. (1961). Identification of phytopathogenic bacteria by means of phage. *Proc. Conference on Scientific Problems of Plant Protection.* 1:187-192 (Review of Plant Pathology, 1961, 40:275).
- KRUEGER, A.P. (1932). The heat inactivation of an antistaphylococcus bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* 15:363-367.
- KUO, T.; CHANG, L.; YANG, C. e YANG, S. (1971). Bacterial leaf blight of rice plant. IV. Effect of bacteriophage on the infectivity of Xanthomonas oryzae. *Bot. Bull. of Academia Sinica* 12:1-9.
- KUO, T.T.; HUANG, T.; WU, R. e YANG, C. (1967). Characterization of three bacteriophages of Xanthomonas oryzae (Ulyeda et Ishiyama) Dowson. *Bot. Bull. of Academia Sinica* 8:246-254.
- KUO, T.; HUANG, T. e YANG, S. (1967). Factors influencing the assay of the bacteriophage of Xanthomonas oryzae by plaque count. *Bot. Bull. of Academia Sinica* 8:30-36.
- KURKDJIAN, A.; BEARDSLEY, R. e MANIGAULT, P. (1968). Bactériophages d'A-grobacterium tumefaciens. II. Souche B6m lysogène dans les tissus de Pisum sativum et effect de la glycine sur la production des phages. *Ann. Inst. Pasteur.* 114:555-561.
- LACAZ, C.S.; FAVA NETTO, C.; FERRI, R.G.; MENDES, E. e MENDES, N.F. (1967). Glossário Ilustrado de Imunologia e de Imunopatologia. Sarvier e Ed. da Universidade de São Paulo, São Paulo. 354 pp.
- LACY, G.H. e LEARY, J.V. (1975). Transfer of a drug resistance (R) plasmid into Pseudomonas glycinea and Pseudomonas phaseolica in vitro and in plant organs. *Proc. of the American Phytopathological Society.* 1:55.

- LANDAETA, A.R. (1968). Analisis y certification fitopatologica de semillas. Rev. Fac. Agron. (Maracay) 4:29-66.
- LEMOS, M.A.; NEDER, R.N. e AZEVEDO, J.L. (1972). Tratamento de sementes de Brassica oleracea var. capitata com antibióticos e sua ação em Xanthomonas campestris. Rev. Microbiol. 3:69-74.
- LIMONARD, T. (1967). Some remarks on the preparation of agar tests in seed health investigation. Proc. Int. Seed Test. Ass. 32:603-614.
- LOVREKOVICH, L. e KLEMENT, Z. (1965). Serological and bacteriophage sensitivity studies on Xanthomonas vesicatoria strains isolated from tomato and pepper. Phytopathol. Z. 52:222-228.
- LUDEKE, E.C. (1972a). On the occurrence and properties of temperate phages of Pseudomonas morsprunorum. I. Isolation and determination of lysogenic bacterial strains. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene 127:409-416. (Review of Plant Pathology, 1974, 53:79).
- LUDEKE, E.C. (1972b). On the occurrence and properties of temperate phages of Pseudomonas morsprunorum. II. Experiments to characterize temperate phages. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene 127:417-428. (Review of Plant Pathology, 1974, 53:79).
- LURIA, S.E. e DARNELL JR., J.E. (1967). General Virology. John Wiley e Sons, New York. 512 pp.
- LWOFF, A. (1953). Lysogeny. Bacteriol. Rev. 17:269-337.
- LWOFF, A.; HORNE, R. e TOURNIER, P. (1962). A system of viruses. Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol. 27:51-55.
- LWOFF, A.; SIMINOVITCH, L. e KJELDGAARD, N. (1950). Induction de la production de bactériophages chez une bactérie lysogène. Ann. Inst. Pasteur 79:815-859.
- LWOFF, A. e TOURNIER, P. (1966). The classification of viruses. Annual Review Microbiology 20:45-74.
- LWOFF, A. e TOURNIER, P. (1971). Remarks on the classification of viruses. In MARAMOROSCH, K. e KURSTAK, E. (Ed.). Comparative virology. Academic Press, New York 584 pp.

- MAGIE, A.R. e WILSON, E.E. (1962). The association of a phage specific for Erwinia nigrifluens with the bark canker disease of Persian walnut. *Phytopathol.* 52:33.
- MANASSE, R.J. e STAPLES, R.C. (1971). Properties of DNA bacteriophages from Agrobacterium tumefaciens. *Phytopathol.* 61:902.
- MANASSE, R.J.; STAPLES, R.C.; GRANADOS, R.R. e BARNES, E.G. (1972). Morphological, biological, and physical properties of Agrobacterium tumefaciens bacteriophages. *Virology* 47:375-384.
- MANDELL, J.D. e EISENSTARK, A. (1953). Factors affecting plaque formation by Xanthomonas pruni bacteriophage. *Phytopathol.* 43:27-29.
- MARSHALL, K.C. (1956). A lysogenic strain of Rhizobium trifolii. *Nature* 177:92.
- MASSEY, R.E. (1934). Studies on blackarm disease of cotton III. *Empire Cotton Growing Rev.* 9:188-193. (Review of Plant Pathology, 1934, 13: 765-766).
- MUNCIE, J.H. e PATEL, M.K. (1930). Studies upon a bacteriophage specific for Pseudomonas tumefaciens. *Phytopathol.* 20:289-305.
- NAMEKATA, T. (1971). Estudos comparativos entre Xanthomonas citri (Hasse) Dow., agente causal do "cancro cítrico" e Xanthomonas citri (Hasse) Dow. N.F.SP. aurantifolia, agente causal da "Cancrose do Limoeiro Galego". Tese de Doutorado, ESALQ, Piracicaba. 65 pp.
- NEAL JR., J.W.; ENNS, W.R. e GOODMAN, R.N. (1964). Sensitivity of bacterial isolates from eggs of Aphis pomi to Erwinia amylovora bacteriophages. *J. Econ. Entomol.* 57:831-832.
- NEERGAARD, P. (1972). International and national cooperation in seed health testing and certification. *Proc. Int. Seed Test. Ass.* 37:117-138.
- NEWBOULD, F.H.S. (1952). Lysis of Rhizobium melilotus in agar films by bacteriophage. *Nature* 169:457-458.
- OKABE, N. e GOTO, M. (1963). Bacteriophages of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 1:397-418.
- PANAPOULOS, N.J.; GUIMARAES, W.V.; CHO, J.J. e SCHROTH, M.N. (1975). Conjugative transfer of Pseudomonas aeruginosa R factors to plant pathogenic Pseudomonas spp. *Phytopathol.* 65:380-388.

- PARKER, D.T. e ALLEN, O.N. (1957). Characteristics of four rhizobiophages active against Rhizobium meliloti. Can. J. Microbiol. 3:651-668.
- PERLASCA, G. (1960). Relationships among isolates of Pseudomonas syringae pathogenic on stone fruit trees. Phytopathol. 50:889-899.
- PFEFFERKORN, E.R.; BURGE, B.W. e COADY, H.M. (1966). Characteristics of the photoreactivation of pseudorabies virus. J. Bacteriol. 92:856-861.
- RANGASWAMI, G. (1957). Development of resistance to streptomycin in Xanthomonas citri and X. malvacearum. Current Science 26:185-186.
- ROBBS, C.F. (1959). Contribuição ao estudo da mancha bacteriana do tomateiro, causada por Xanthomonas vesicatoria. In ROBBS, C.F. (1959). Bacterioses fitopatogênicas no Brasil. Inst. de Economia Rural. Série Divulgação de Pesquisas, nº 2. Itaguaí, Rio de Janeiro. 63 pp.
- ROSBURG, D.W. e PARRACK, A.L. (1955). The electron microscopy of a bacteriophage attacking Xanthomonas malvacearum. Phytopathol. 45:49-51.
- ROSLYCKY, E.B.; ALLEN, O.N. e McCOY, E. (1962). Phages for Agrobacterium radiobacter with reference to host range. Can. J. Microbiol. 8:71-78.
- ROUSSAUX, J.; KURKDJIAN, A. e BEARDSLEY, R.E. (1968). Bactériophages d'Agrobacterium tumefaciens. I. Isolament et caractères. Ann. Inst. Pasteur 114:237-247.
- ROVOZZO, G.C. e BURKE, C.N. (1973). A manual of basic virological techniques. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs. 287 pp.
- RUPERT, C.S. (1962). Photoenzymatic repair of ultraviolet damage in DNA. I. Kinetics of the reaction. II. Formation of an enzyme substrate complex. J. Gen. Physiol. 45:703-741.
- SALLE, A.J. (1961). Fundamental Principles of Bacteriology. McGraw-Hill Book Company, New York. 812 pp.
- SAMIILENKO, V.I. e GVOZDYAK, R.I. (1972). Distribution of bacteriophages of Pseudomonas spp causing legume diseases in the rhizosphere of crop plants. Mikrobiologichnii Zhurnal 34:518-520. (Review of Plant Pathology, 1973, 52:2).
- SCHWINGHAMER, E.A. (1966). Factors affecting phage-restricting ability in Rhizobium leguminosarum strain L4. Can. J. Microbiol. 12:395-407.

- SHACKLETON, D.A. (1962). A method for the detection of Xanthomonas campestris (Pammel, 1895) Dowson, 1939, in Brassica seed. Nature 193:78.
- SINGH, R.P.; RAO, Y.P. e VERMA, J.P. (1970). A bacteriophage against Xanthomonas malvacearum (E.F. Smith) Dowson, the incitant of black arm of cotton. Current Science 39:216.
- STANIEWSKI, R. (1970). Typing of Rhizobium by phages. Can. J. Microbiol. 16:1003-1009.
- STARR, M.P. (1959). Bacteria as plant pathogens. Annual Review Microbiology 13:211-238.
- STOLP, H. (1956). Bakteriophagenforschung und Phytopathologie (Ein Sammelreferat). Phytopathol. Z. 26:171-218.
- STOLP, H. (1961). Neue Erkenntnisse über phytopathogene Bakterien und die von ihnen verursachten Krankheiten. I. Verwandtschaftsbeziehungen zwischen phytopathogenen Pseudomonas "Arten" und saprophytischen Fluoreszenten auf der Grundlage von Phagenreaktionen. Phytopathol. Z. 42:197-262.
- STOLP, H. e STARR, M.P. (1964). Bacteriophage reactions and speciation of phytopathogenic Xanthomonads. Phytopathol. Z. 51:442-478.
- STOLP, H.; STARR, M.P. e BAIGENT, N.L. (1965). Problems in speciation of phytopathogenic Pseudomonads and Xanthomonads. Annual Review of Phytopathology 3:231-264.
- STONIER, R.; McSHARRY, J. e SPEITEL, T. (1967). Agrobacterium tumefaciens Conn. IV. Bacteriophage PB2₁ and its inhibitory effect on tumor induction. J. Virol. 1:268-273.
- SUTTON, M.D. (1966). Bacteriophages of Pseudomonas atrofaciens in cereal seeds. Phytopathol. 56:727-730.
- SUTTON, M.D. e KATZNELSON, H. (1953). Isolation of bacteriophages for the detection and identification of some seed-borne pathogenic bacteria. Can. J. Botany 31:201-305.
- SUTTON, M.D.; KATZNELSON, H. e QUADLING, C. (1958). A bacteriophage that attacks numerous phytopathogenic Xanthomonas species. Can. J. Microbiol. 4:493-497.
- SUTTON, M.D. e QUADLING, C. (1963). Lysogeny in a strain of Xanthomonas campestris. Can. J. Microbiol. 9:821-828.

- SUTTON, M.D. e WALLEN, W.R. (1967). Phage types of Xanthomonas phaseoli isolated from beans. Can. J. Botany 45:267-280.
- TAKAHASHI, I. e QUADLING, C. (1961). Lysogeny in Rhizobium trifolii. Can. J. Microbiol. 7:455-465.
- TAYLOR, J.D. (1970). Bacteriophage and serological methods for the identification of Pseudomonas phaseolicola (Burkh.) Dowson. Ann. Appl. Biol. 66:387-395.
- TAYLOR, J.D. (1972). Specificity of bacteriophages and antiserum for Pseudomonas pisi. N.Z. Journal of Agricultural Research 15:421-431.
- TEMPE, J. (1970). Routine methods for determining the health condition of seeds in the seed testing station. Proc. Int. Seed Test. Ass. 35:3-42.
- TEMPE, J. e CROSIER, W.F. (1959). General Introduction. In Handbook on Seed Health Testing. The International Seed Testing Association, Copenhagen. 159 pp.
- THOMAS, R.C. (1935). A bacteriophage in relation to Stewart's disease of corn. Phytopathol. 25:371-372.
- THOMAS, R.C. (1943). The bacteriophage reaction as a mean of quick identification of pathogenic bacteria. Phytopathol. 33:1119-1120.
- THOMAS, R.C. (1947). The bacteriophage reaction for the identification of bacteria. Ohio Agr. Exp. Sta. Tech. Bul. 11. 12 pp.
- THOMSON, J.R. (1969). Seed health certification. ISTA News Bull. 28:5-8.
- THORNBERRY, H.H.; BRAUN, A.C. e ELROD, R.P. (1949). Application of the bacteriophage-lysis technique for the identification of plant pathogenic bacteria. Phytopathol. 39:152-154.
- THORNBERRY, H.H.; EISENSTARK, A. e ANDERSON, H.W. (1948). Studies on the bacteriophage of Xanthomonas pruni. Phytopathol. 38:907-911.
- VANDECAVEYE, S.C. e KATZNELSON, H. (1936). Bacteriophage as related to the root nodule bacteria of alfalfa. J. Bacteriol. 31:465-477.
- VAN DER PLANK, J.E. (1963). Plant Diseases: Epidemics and Control. Academic Press, New York. 349 pp.
- VIDAVER, A.K. e SCHUSTER, M.L. (1969). Characterization of Xanthomonas phaseoli bacteriophages. J. Virol. 4:300-308.

- WALKER, J.C. (1969). Plant Pathology. McGraw-Hill Book Company, New York. 819 pp.
- WALLEN, V.R. e SUTTON, M.D. (1965). Xanthomonas phaseoli var. fuscans (Burkh.) Starr e Burkh. on field bean in Ontario. Can. J. Botany 43: 437-446.
- WENTWORTH, B.B. (1963). Bacteriophage typing of the staphylococci. Bacteriol. Rev. 27:253-272.
- WERBIN, H.; HIDALGO-SALVATIERRA, O.; SEER, J. e McLAREN, A.D. (1966). Comparative photoreactivation of ultraviolet light-inactivated tobacco mosaic virus ribonucleic acid on Chenopodium, pinto bean and tobacco plants. Virology 28:202-207.
- WILSON, E.E. e MAGIE, A. (1962). Host, physiological, and phage relations of Pseudomonas savastangi and Pseudomonas tonelliana. Phytopathol. 52: 33.
- WULFF, D.L. (1963). The role of thymine dimer in the photo-inactivation of the bacteriophage T4_{v1}. J. Mol. Biol. 7:431-441.
- WULFF, D.L. e RUPERT, C.S. (1962). Disappearance of thymine photodimer in ultraviolet irradiated DNA upon treatment with a photoreactivating enzyme from baker's Yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun. 7:237-240.
- YOUNGNER, J.S. (1957). Thermal inactivation studies with different strains of poliovirus. J. Immunol. 78:282-290.
- ZEITOUN, F.M. e WILSON, Z.E. (1969). The relation of bacteriophage to the walnut tree pathogens, Erwinia nigrifluens and Erwinia rubrifaciens. Phytopathol. 59:756-761.
- ZIMMERER, R.P.; HAMILTON, R.H. e POOTJES, C. (1966). Isolation and morphology of temperate Agrobacterium tumefaciens bacteriophage. J. Bacteriol. 92:746-750.

APÊNDICE

Apêndice 1 - Efeito de diversos tempos de exposição a diversas temperaturas sobre o número de partículas viáveis do fago *

Tempo (minutos)	Temperaturas (°C)				
	50	55	60	65	70
0	$1,00 \cdot 10^5$				
30	$1,10 \cdot 10^5$	$8,80 \cdot 10^4$	$7,40 \cdot 10^4$	$5,40 \cdot 10^3$	$3,00 \cdot 10^1$
60	$0,95 \cdot 10^5$	$2,30 \cdot 10^4$	$9,70 \cdot 10^3$	$7,10 \cdot 10^2$	-
90	$0,89 \cdot 10^5$	$1,30 \cdot 10^4$	$6,20 \cdot 10^3$	$4,00 \cdot 10^2$	-
120	$0,96 \cdot 10^5$	$7,40 \cdot 10^3$	$1,30 \cdot 10^3$	$1,90 \cdot 10^2$	-
150	$1,05 \cdot 10^5$	$3,20 \cdot 10^3$	$4,30 \cdot 10^2$	$2,00 \cdot 10^1$	-
180	$0,80 \cdot 10^5$	$2,00 \cdot 10^3$	$4,40 \cdot 10^2$	-	-
210	$0,91 \cdot 10^5$	$1,80 \cdot 10^3$	$9,00 \cdot 10^1$	-	-
240	$0,95 \cdot 10^5$	$5,60 \cdot 10^2$	$2,00 \cdot 10^1$	-	-

* média de 3 placas

Apêndice 2 - Efeito de luz ultravioleta e da fotorreativação na viabilidade do bacteriófago inoculado em Xanthomonas campestris

Tempo de exposição (segundos)	Número de partículas viáveis por ml após incubação no	
	escuro*	claro*
0	$1,00 \cdot 10^5$	$1,00 \cdot 10^5$
5	$5,80 \cdot 10^4$	$8,25 \cdot 10^4$
10	$3,35 \cdot 10^4$	$7,50 \cdot 10^4$
15	$2,07 \cdot 10^4$	$2,52 \cdot 10^4$
20	$6,00 \cdot 10^3$	$2,01 \cdot 10^4$
25	$1,31 \cdot 10^3$	$3,67 \cdot 10^3$
30	$4,10 \cdot 10^2$	$5,27 \cdot 10^3$
35	$1,85 \cdot 10^2$	$1,13 \cdot 10^3$
40	$3,10 \cdot 10^2$	$8,10 \cdot 10^2$
45	$7,00 \cdot 10^1$	$5,20 \cdot 10^2$
50	$2,00 \cdot 10^1$	$4,65 \cdot 10^2$
55	-	$1,50 \cdot 10^2$
60	-	$7,00 \cdot 10^1$
65	-	-

* média de 2 placas

Apêndice 3 – Efeito de luz ultravioleta e da fotorreativação na viabilidade do bacteriófago inoculado em Xanthomonas vesicatoria

Tempo de exposição (segundos)	Número de partículas viáveis por ml após incubação no	
	escuro*	claro*
0	$1,00 \cdot 10^5$	$1,00 \cdot 10^5$
5	$6,20 \cdot 10^4$	$7,15 \cdot 10^4$
10	$3,35 \cdot 10^4$	$3,90 \cdot 10^4$
15	$8,20 \cdot 10^3$	$2,11 \cdot 10^4$
20	$2,05 \cdot 10^3$	$1,50 \cdot 10^4$
25	$1,18 \cdot 10^3$	$2,60 \cdot 10^3$
30	$8,45 \cdot 10^2$	$2,00 \cdot 10^3$
35	$2,45 \cdot 10^2$	$5,50 \cdot 10^2$
40	$2,00 \cdot 10^2$	$2,80 \cdot 10^2$
45	$1,00 \cdot 10^2$	$1,40 \cdot 10^2$
50	$1,50 \cdot 10^1$	$8,50 \cdot 10^1$
55	-	$5,00 \cdot 10^1$
60	-	-
65	-	-

* média de 2 placas

Apêndice 4 - Número de partículas de vírus livres, em diversos tempos, quando misturadas com um excesso de Xanthomonas campestris

Tempo (minutos)	Número de partículas por ml *			
	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Média
0	$1,00 \cdot 10^5$	$1,00 \cdot 10^5$	$1,00 \cdot 10^5$	$1,00 \cdot 10^5$
5	$8,70 \cdot 10^4$	$9,10 \cdot 10^4$	$7,60 \cdot 10^4$	$8,46 \cdot 10^4$
10	$6,20 \cdot 10^4$	$7,20 \cdot 10^4$	$7,40 \cdot 10^4$	$6,93 \cdot 10^4$
15	$1,20 \cdot 10^4$	$2,50 \cdot 10^4$	$2,80 \cdot 10^4$	$2,16 \cdot 10^4$
20	$1,05 \cdot 10^4$	$1,90 \cdot 10^4$	$2,00 \cdot 10^4$	$1,65 \cdot 10^4$
25	$9,20 \cdot 10^3$	$1,02 \cdot 10^4$	$8,70 \cdot 10^3$	$9,36 \cdot 10^3$
30	$9,00 \cdot 10^3$	$7,60 \cdot 10^3$	$8,90 \cdot 10^3$	$8,50 \cdot 10^3$

* média de 3 placas

Apêndice 5 - Número de partículas de vírus livres, em diversos tempos, quando misturadas com um excesso de Xanthomonas vesicatoria

Tempo (minutos)	Número de partículas por ml *			
	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Média
0	$1,00 \cdot 10^5$	$1,00 \cdot 10^5$	$1,00 \cdot 10^5$	$1,00 \cdot 10^5$
5	$9,80 \cdot 10^4$	$1,05 \cdot 10^5$	$9,80 \cdot 10^4$	$1,00 \cdot 10^5$
10	$8,00 \cdot 10^4$	$9,90 \cdot 10^4$	$1,01 \cdot 10^5$	$9,33 \cdot 10^4$
15	$5,00 \cdot 10^4$	$6,10 \cdot 10^4$	$6,70 \cdot 10^4$	$5,93 \cdot 10^4$
20	$2,60 \cdot 10^4$	$4,20 \cdot 10^4$	$3,20 \cdot 10^4$	$3,33 \cdot 10^4$
25	$9,70 \cdot 10^3$	$3,00 \cdot 10^4$	$2,10 \cdot 10^4$	$2,02 \cdot 10^4$
30	$8,70 \cdot 10^3$	$9,70 \cdot 10^3$	$1,30 \cdot 10^4$	$1,04 \cdot 10^4$

* média de 3 placas

Apêndice 6 - Número de partículas viáveis do bacteriófago, em diversos tempos, tendo Xanthomonas campestris como hospedeira

Tempo (minutos)	1ª repetição	2ª repetição	3ª repetição	Média
30	1,00	1,00	1,00	1,00
60	1,57	0,74	0,91	1,07
90	1,23	0,59	0,81	0,88
120	1,75	1,81	2,44	2,00
150	13,78	11,75	10,03	11,85
180	30,55	24,43	23,14	26,04
210	46,63	28,33	30,40	35,12
240	40,94	27,75	26,64	31,78
270	34,78	28,91	30,23	31,31
300	41,25	30,65	34,50	35,47

Apêndice 7 - Número de partículas viáveis do bacteriófago, em diversos tempos, tendo Xanthomonas vesicatoria como hospedeira

Tempo (minutos)	1ª repetição	2ª repetição	3ª repetição	Média
30	1,00	1,00	1,00	1,00
90	2,14	1,00	1,13	1,42
420	0,90	1,13	0,89	0,97
450	1,50	1,09	1,22	1,27
480	7,60	4,12	5,15	5,62
510	19,82	10,47	12,22	14,17
540	29,01	14,73	21,16	21,63
570	55,51	51,92	35,38	47,60
600	55,18	50,64	32,11	45,98
630	67,30	45,04	34,84	49,06

Apêndice 8 - Efeito de diversos tratamentos com o bacteriófago no número de lesões causadas por Xanthomonas campestris em repolho

B1	B2	B3	B1	B2	B3	B1	B2	B3
T7			T6			T5		
248*	318	623	506	548	243	293	225	213
117	526	179	458	418	354	313	335	299
500	679	71	154	195	341	-	438	206
-	-	174	186	-	249	-	-	-
T4			T3			T2		
259	202	75	62	62	90	30	14	32
145	451	244	55	75	77	21	11	32
137	651	120	152	236	97	4	17	2
140	51	250	53	-	9	-	22	-
-	-	-	-	-	-	-	57	-
T1			T0			T + 1		
15	0	11	0	0	0	27	65	10
1	73	5	0	5	0	139	181	66
29	36	39	0	0	0	141	199	36
32	-	9	0	-	0	35	56	121
-	-	-	-	-	-	71	22	-
T + 2			T + 3			T + 4		
243	341	414	536	206	408	227	421	349
303	160	162	323	224	298	309	206	209
341	233	159	144	581	152	256	319	260
254	-	142	225	-	-	249	481	-
TB			TF			TT		
246	362	529	0	0	0	0	0	0
457	515	179	0	0	0	0	0	0
305	89	208	0	0	0	0	0	-
421	-	-	0	-	-	0	0	-

B1 = Bloco 1
 B2 = Bloco 2
 B3 = Bloco 3

* número de lesões por planta

Apêndice 9 - Efeito de diversos tratamentos com o bacteriófago no número de lesões causadas por Xanthomonas vesicatoria em pimentão

B1	B2	B3	B1	B2	B3	B1	B2	B3
T7			T6			T5		
32*	55	81	15	15	61	41	67	88
20	58	72	26	81	56	17	42	18
39	38	56	5	62	92	42	38	63
-	41	10	42	17	33	28	55	57
-	31	47	13	-	26	-	21	95
-	62	-	-	-	-	-	-	-
T4			T3			T2		
60	38	51	41	15	32	18	8	17
26	70	62	32	18	47	21	13	49
35	52	73	21	41	56	35	38	13
15	-	80	13	38	12	17	19	11
-	-	35	-	61	-	5	21	20
-	-	26	-	-	-	-	-	-
T1			T0			T + 1		
21	14	6	6	1	3	26	60	55
3	8	13	1	4	1	31	31	13
7	21	18	0	2	0	10	47	19
10	3	-	0	0	10	14	28	72
1	12	-	0	7	-	72	12	38
T + 2			T + 3			TB		
37	42	71	62	15	80	61	63	90
76	61	62	38	61	86	32	71	37
69	36	48	27	50	17	56	17	56
52	56	-	35	-	40	40	43	31
11	15	-	-	-	-	-	-	82
39	81	-	-	-	-	-	-	-
TF			TT			TT		
0	0	0				0	0	0
0	0	0				0	0	0
0	0	0				0	0	0
0	0	0				-	0	0
0	0	-				-	0	-

B1 = Bloco 1

B2 = Bloco 2

B3 = Bloco 3

* número de lesões por planta