

ATIVIDADE BACTERIOCINOGÊNICA, RESISTÊNCIA A ANTI-  
BIÓTICOS E MÉTODOS RÁPIDOS PARA DETERMINAÇÃO  
DA PATOGENICIDADE EM *Pseudomonas glycinea* Coerper

**Walter Ferreira Becker**

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. Armando Bergamin Filho

Dissertação apresentada à Escola Superior de  
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de  
São Paulo, para obtenção do título de Mestre em  
Fitopatologia

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Novembro - 1980

À

*memória dos meus irmãos*

*Gilberto , Rejane e Volmar*

*Aos meus pais,*

*e*

*irmãos*

**D E D I C O**

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

O autor expressa seus agradecimentos às pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho, especialmente:

- Ao Prof. Dr. Armando Bergamin Filho, pela valiosa e eficiente orientação, apoio e estímulo durante a realização e redação deste trabalho;
- Ao Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pela possibilidade da realização do curso de Pós-graduação;
- À Coordenadora de Aperfeiçoamento de Pessoal Docente (CAPES), através do PICD / UFSM , pela concessão da bolsa de estudos;
- Ao Prof. Dr. Hiroshi Kimati, pela inestimável e constante colaboração no planejamento, execução, redação e revisão dos originais do presente trabalho;
- Aos Professores do Departamento de Fitopatologia da E. S. A. "Luiz de Queiroz", pelos valiosos ensinamentos;
- Ao Eng<sup>o</sup>-Agr<sup>o</sup> Léo Pires Ferreira, pela remessa de vários isolados de *Pseudomonas glycinea*;
- Ao Colega Pablo Gusman Vargas, pela obtenção das fotografias;
- À Eng<sup>a</sup>-Agr<sup>a</sup> Rosa Maria V. Sanhueza, pela correção do resumo, em inglês;

- Ao Eng<sup>o</sup>-Agr<sup>o</sup> José Fernando S. Dias, pela análise estatística;
- Aos Professores da disciplina de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), na pessoa da Dr.<sup>a</sup> Elocy Minussi, pelo apoio e amizade;
- A Psicóloga Izabel Cristina Emmel, pelo carinho e estímulo constante;
- Aos Colegas do Curso de Pós-Graduação e Funcionários do Departamento de Fitopatologia da E. S. A. "Luiz de Queiroz", pela amizade e colaboração.

## Í N D I C E

	Pág.
1 - RESUMO .....	1
2 - INTRODUÇÃO .....	3
3 - REVISÃO DE LITERATURA .....	6
3.1 - O Patógeno .....	6
3.2 - Hipersensibilidade .....	8
3.3 - Meio de Tetrazolium .....	11
3.4 - Bacteriocinas .....	14
3.5 - Serologia .....	21
3.6 - Resistência a Drogas .....	26
4 - MATERIAIS E MÉTODOS .....	30
4.1 - Local da Pesquisa .....	30
4.2 - Origem e Coleta dos Isolados .....	30
4.3 - Meios de Cultura e Antibióticos .....	32
4.3.1 - Meios de cultura .....	32
4.3.2 - Antibióticos .....	34
4.4 - Isolamento, Identificação e Conservação do Patógeno .....	34
4.4.1 - Isolamento .....	34
4.4.2 - Identificação .....	36
4.4.3 - Conservação do Patógeno .....	37

	Pág.
4.5 - Detecção da Patogenicidade Através da Hipersensibilidade em Folhas de Fumo .....	38
4.6 - Relação entre Patogenicidade e Morfologia de Colônias de <i>Pseudomonas glycinea</i> em Meio de Tetrazolium .....	39
4.7 - Relação entre o Tipo de Colônia em Meio de Tetrazolium e Hipersensibilidade em Folhas de Fumo .....	41
4.8 - Produção de Bacteriocina .....	41
4.9 - Serologia .....	43
4.9.1 - Preparo dos Antígenos .....	43
4.9.2 - Obtenção do Antissoros .....	45
4.9.3 - Reação serológica dos isolados .....	46
4.9.4 - Titulação do antígeno e antissoros ...	47
4.9.5 - Teste para rápida identificação serológica ao patógeno nos tecidos infectados do hospedeiro .....	48
4.10 - Resistência a Antibióticos .....	48
4.10.1 - Determinação dos níveis de resistência .....	48
4.10.2 - Mutantes resistentes à estreptomina em relação a bacteriocinas e patogenicidade .....	50
5 - RESULTADOS .....	51
5.1 - Isolamento, Identificação do Patógeno e Caracterização dos Saprófitas .....	51

	Pág.
5.2 - Detecção da Patogenicidade Através da Hipersensibilidade em Folhas de Fumo .....	52
5.3 - Relação entre Patogenicidade e Morfologia de Colônias de <i>Pseudomonas gly-</i> <i>cinea</i> em Meio de Tetrazolium .....	52
5.4 - Relação entre o Tipo de Colônia em Meio de Tetrazolium e Hipersensibilidade em Folhas de Fumo .....	56
5.5 - Produção de Bacteriocinas .....	57
5.6 - Serologia .....	60
5.6.1 - Reação serológica dos isolados .....	60
5.6.2 - Titulação do antígeno e antissoro ...	62
5.6.3 - Teste para rápida identificação <u>se</u> rológica do patógeno nos tecidos <u>in</u> fectados do hospedeiro .....	67
5.7 - Resistência a Antibióticos .....	67
5.7.1 - Determinação da concentração máxi- ma não inibitória .....	67
5.7.2 - Isolamento de mutantes resistentes à estreptomicina em relação a bac- teriocinas e patogenicidade .....	69
6 - DISCUSSÃO .....	73
6.1 - Detecção da Patogenicidade Através da Hipersensibilidade em Folhas de Fumo .....	73
6.2 - Relação entre a Patogenicidade e Morfologia de Colônias de <i>Pseudomonas gly-</i> <i>cinea</i> em Meio de Tetrazolium .....	75

6.3 - Relação entre o Tipo de Colônia em Meio de Tetrazolium e Hipersensibilidade em Folhas de Fumo .....	76
6.4 - Produção de Bacteriocinas .....	77
6.5 - Reação Serológica dos Isolados .....	80
6.6 - Titulação do Antígeno e Antissoros .....	81
6.6.1 - Titulação do antígeno .....	81
6.6.2 - Titulação dos antissoros .....	82
6.7 - Teste para Rápida Identificação Serológica do Patógeno, nos Tecidos Infectados do Hospedeiro .....	83
6.8 - Resistência a Antibióticos: Concentração Máxima não Inibitória e Relação entre Mutantes Resistentes com Produção de Bacteriocina e Patogenicidade .....	84
7 - CONCLUSÕES .....	87
8 - SUMMARY .....	89
9 - LITERATURA CITADA .....	91

## LISTA DE TABELAS

	Pág.
TABELA 1 - Relação dos isolados de <i>P. glycinea</i> e suas respectivas procedências .....	31
TABELA 2 - Reação de hipersensibilidade em folha de fumo (cultivar Virginia Coker 254) e sua correlação com patogenicidade em soja (cultivar Santana), de 13 isolados de <i>Pseudomonas glycinea</i> e três bactérias saprófitas fluorescentes .....	53
TABELA 3 - Relação entre a patogenicidade em soja (cultivar Santana) e morfologia da colônia de <i>Pseudomonas glycinea</i> , isolado B <sub>13</sub> , em meio de tetrazolium em função das médias do diâmetro, em milímetros da área afetada .....	55
TABELA 4 - Relação entre a patogenicidade em soja (cultivar Santana) e morfologia da colônia de <i>Pseudomonas glycinea</i> , isolado B <sub>69</sub> , em meio de tetrazolium em função das médias do diâmetro, em milímetros, da área afetada .....	56
TABELA 5 - Relação entre a hipersensibilidade em fumo (cultivar Virginia Coker 254) e a morfologia da colônia, em meio de tetrazolium, de seis isolados de <i>Pseudomonas glycinea</i> .....	58

TABELA 6 - Sensibilidade dos 13 isolados de <i>Pseudomonas glycinea</i> como indicadores de bacteriocinas quando testados contra os mesmos isolados como produtores .....	59
TABELA 7 - Comportamento serológico dos isolados de <i>Pseudomonas glycinea</i> , submetidos ao aquecimento a 100°C e a maceração, frente aos antissoros AS <sub>4</sub> e AS <sub>10</sub> , pelo método de dupla difusão em gel de agar .....	61
TABELA 8 - Titulação do antígeno (isolado B0 <sub>4</sub> ), submetido ao aquecimento a 100°C, pelo método de dupla difusão em gel de agar em relação aos antissoros .....	63
TABELA 9 - Titulação do antígeno (isolado B0 <sub>4</sub> ), submetido à maceração, pelo método de dupla difusão em gel de agar, em relação aos antissoros .....	64
TABELA 10 - Titulação dos antissoros, em relação ao antígeno homólogo (isolado B0 <sub>4</sub> ), aquecido a 100°C, pelo método de dupla difusão em gel de agar .....	65
TABELA 11 - Titulação dos antissoros, em relação ao antígeno homólogo (isolado B0 <sub>4</sub> ), submetido à maceração, pelo método de dupla difusão em gel de agar .....	66

	Pág.
TABELA 12 - Níveis de resistência dos 13 isolados de <i>Pseudomonas glycinea</i> expressos em µg do antibiótico por ml de meio de cultura .....	68
TABELA 13 - Crescimento dos isolados originais B0 <sub>4</sub> e B <sub>13</sub> em comparação com os mutantes resistentes à estreptomicina em diferentes concentrações da droga .....	71
TABELA 14 - Comparação da capacidade patogênica e a produção de bacteriocina das linhagens originais e seus mutantes resistentes à estreptomicina .....	72

LISTA DE FIGURA

	Pág.
FIGURA 1 - Colônias de <i>Pseudomonas glycinea</i> em meio de tetrazolium .....	54

## 1 - RESUMO

A reação de hipersensibilidade em folhas de fumo, serologia e meio de tetrazolium foram testados para identificar rapidamente, isolados patogênicos de *Pseudomonas glycinea*. A produção de bacteriocina pelos isolados e a resistência a antibióticos também foi investigada.

Tanto a reação de hipersensibilidade, quanto a serologia foram úteis para distinguir o patógeno de outras bactérias saprófitas fluorescentes. Dois tipos de colônias foram observadas quando suspensões bacterianas, provenientes de culturas estoque de *Pseudomonas glycinea*, foram cultivadas em meio de tetrazolium: um tipo apresentou colônia inteiramente vermelha, circular, com bordo branco estreito e diâmetro de 1,5 mm a 2,0 mm (tipo I) e outro, colônia com centro rosa e vermelho, circular, com bordo branco largo e diâmetro de 1,0 mm

a 2,0 mm (tipo II) ; culturas derivadas do primeiro tipo foram fracamente patogênicas enquanto aquelas do segundo tipo foram altamente patogênicas no cultivar Santana.

Dentre os 13 isolados de *Pseudomonas glycinea*, cinco foram produtores de bacteriocinas, não havendo, entretanto, relação entre a produção desta substância e reação serológica dos isolados.

A sensibilidade a antibióticos dos isolados estimada pela máxima concentração não inibitória (MCNI) foi: 4,0 - 8,0 µg/ml para Kasugamicina ; 0,16 - 0,32 µg/ml para Estreptomicina e Tetraciclina e, 0,02 - 0,04 µg/ml para Terramicina. Mutantes resistentes a Estreptomicina (250 - 500 µg/ml MCNI) obtidos "in vitro" foram afetados na patogenicidade, mas não em sua capacidade bacteriocinogênica.

## 2 - INTRODUÇÃO

O Crestamento Bacteriano, causado por *Pseudomonas glycinea* Coerper, destaca-se entre as bacterioses da soja por ser a de ocorrência mais generalizada, estando presente em praticamente, todas as partes do mundo. O patógeno é mais comum em regiões com clima fresco e úmido (SINCLAIR, 1977) podendo haver limites na produção quando as condições são favoráveis ao seu desenvolvimento (SINCLAIR e SHURTLEFF, 1975). Na Coréia, esta doença é responsável anualmente por cerca de 10% de perdas nas lavouras de soja (CHOO e YOO, 1977), sendo também uma das doenças mais comuns e importantes no Zâmbia (JAVAID e ASHRAF, 1978), causando completa desfolhação. Nos Estados Unidos, este é, provavelmente, o patógeno mais largamente distribuído na região centro-norte (LEBEN , DAFT e SCHMITTHENNER, 1968).

No Brasil, através de levantamentos da ocorrência de doenças da soja nos Estados da região sul, realizados por FERREIRA (1971) e SCHUCK (1973), foi constatado que o Crescimento Bacteriano era uma das doenças mais proeminentes. Posteriormente, LEHMAN *et alii* (1976) constataram-na em cerca de 73% das lavouras observadas.

O primeiro passo na diagnose da doença é a obtenção do agente patogênico. Porém, através do método normalmente preconizado, isolamento em nutriente-agar, dificuldades são encontradas pela presença constante de flora bacteriana não-patogênica (LEBEN *et alii*, 1968). *Pseudomonas saprófitas* que ocorrem conjuntamente nos órgãos afetados, apresentam características morfológicas e bioquímicas semelhantes àquelas do patógeno (KLEMENT, 1963). Na prática, a aplicação dos postulados de Koch é o único método digno de confiança que pode ser usado para esta finalidade, mas a obtenção das respostas demandam algum tempo além de depender da disponibilidade do hospedeiro adequado.

Entretanto, existem possibilidades que permitem uma rápida distinção entre bactérias patogênicas e aquelas tidas como saprófitas, tais como:

- a - O método utilizado por KELMAN (1954) que se fundamenta na diferença de coloração exibida pelas colônias de bactérias patogênicas e, fracamente ou não-patogênicas quando semeadas em meio de cultura contendo cloreto de trifênil tetrazolium.

- b - A reação de hipersensibilidade em folhas de fumo (*Nicotia na tabacum* L.), desenvolvida por KLEMENT (1963), dada à capacidade das formas patogênicas de *Pseudomonas* induzirem nos tecidos inoculados, uma reação de hipersensibilidade.
- c - A serologia, empregada com sucesso para fins de identificação de microorganismos desde o começo deste século. Atualmente tal técnica permite a diferenciação entre isolados do mesmo organismo agrupando-os em serotipos (YAKRUS e SHAAD, 1979).

Além disso, quando se consideram estudos epidemiológicos, é importante que se possa caracterizar o comportamento de raças dentro da espécie do organismo em questão. Como uma colaboração neste sentido, além da serologia, vários pesquisadores têm utilizado tanto a produção de bacteriocinas inicialmente estudadas em *E. coli* por Gratia em 1925 (REEVES, 1965) como também os diferentes níveis de resistência aos antibióticos. Ao contrário da patologia médica, os estudos a esse respeito em bactérias fitopatogênicas são menos numerosos.

Embora os assuntos comentados anteriormente sejam do conhecimento dos pesquisadores, pouco tem sido estudado em relação a *Pseudomonas glycinea*. Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo apurar métodos que determinassem com rapidez a bactéria responsável pelo Crestamento Bacteriano, bem como verificar a possível produção de bacteriocinas pelo patógeno e o comportamento dos mutantes resistentes a antibióticos.

### 3 - REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 - O PATÓGENO

No começo deste século, alguns pesquisadores, Heald, Clinton (COERPER, 1919) e JOHNSON e COERPER (1917), mencionaram o aparecimento de uma bacteriose sobre a soja em alguns Estados norte-americanos. Entretanto, COERPER (1919) foi quem pesquisou mais detalhadamente o desenvolvimento da doença, bem como os aspectos morfológicos e bioquímicos do patógeno, classificando-o como *Bacterium glycineum*. Um ano mais tarde, WOLF (1920) descreveria uma doença bastante similar tendo denominado o patógeno de *Bacterium sojæ*. Comparações posteriores (SHUNK e WOLF, 1921) dos sintomas causados pelos dois organismos não permitiu distinguí-los, a não ser por escassas características bioquímicas. Outras tentativas de classificação do patógeno se seguiram antes que Stapp, em 1928, o clas

sificasse definitivamente como *Pseudomonas glycinea* (BERGEY *et alii*, 1939).

Atualmente, há um consenso por parte dos pesquisadores no sentido de rever os vários gêneros de bactérias. Assim, devido à falta de características distintas e à variabilidade dos resultados de testes bioquímicos, muitas *Pseudomonas* fluorescentes, arginina dihidrolase negativa e com capacidade de induzir reação de hipersensibilidade no fumo, entre as quais *Pseudomonas glycinea*, têm sido consideradas como patótipos de *Pseudomonas syringae* (DOUDOROFF e PALLERONI, 1974; YOUNG *et alii*, 1978). Como esta proposição ainda não é amplamente aceita, o patógeno utilizado neste estudo é denominado *Pseudomonas glycinea*.

No Brasil, a primeira citação da ocorrência deste patógeno foi feita por BITTANCOURT (1934) na relação de doenças observadas na seção de Fitopatologia do Instituto Biológico de São Paulo, durante os anos de 1931 e 1932.

Levantamentos da ocorrência de bacterioses (FERREIRA, 1971 ; SCHUCK, 1973) , indicam que o cretamento bacteriano está presente em todas as áreas de cultivo da soja, muitas vezes em índices mais elevados do que a outras doenças.

### 3.2 - HIPERSENSIBILIDADE

As alterações morfológicas e histológicas iniciadas por um agente infeccioso, levando os tecidos infectados à necrose prematura, com conseqüente inativação e localização deste agente, é definida como reação de hipersensibilidade.

Em plantas infectadas com organismos fitopatogênicos, este fenômeno tem sido mais estudado nas doenças causadas por fungos e vírus (MULLER, 1959). A possibilidade de que bactérias fitopatogênicas fossem também capazes de induzir a reação de hipersensibilidade foi posteriormente demonstrada (KLEMENT e LOVREKOVICH, 1962 ; KLEMENT, 1963), principalmente em relação ao gênero *Pseudomonas*.

Anteriormente, os métodos disponíveis para identificação de bactérias baseavam-se nas características morfológicas, bioquímicas e sensibilidade aos fagos. Além da morosidade dos testes, a confiabilidade ficava prejudicada, uma vez que os resultados, em alguns casos, eram idênticos para bactérias saprófitas e patogênicas. Tal condição, principalmente verdadeira para as *Pseudomonas* (STOLP, 1961), implicava na necessidade dos Postulados de Koch para a diferenciação entre as bactérias.

O uso da reação de hipersensibilidade em plantas tornou possível eliminar algumas dificuldades facilitando a identificação do patógeno. Para tanto, no começo utilizava-se feijão (*Phaseolus vulgaris*), com ótimos resultados, merecendo a observação de KLEMENT e LOVREKOVICH (1961): "Como mate-

rial-teste o feijão poderia ter, por extensão, o mesmo papel na fitopatologia que os animais convencionais de laboratório na medicina". Na ocasião, estes autores haviam testado espécies de *Pseudomonas* e *Xanthomonas*, incluindo saprófitas e patogênicas; como resultado, todas as espécies fitopatogênicas (exceto aquelas ao feijão) induziram reação necrótica. Espécies saprófitas não produziram qualquer sintoma.

Posteriormente, KLEMENT (1963) transferiu esta metodologia para plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) com resultados altamente satisfatórios, injetando suspensões de várias *Pseudomonas* spp. Em combinações parassimbióticas houve necrose dos tecidos ao terceiro dia; combinações eussimbióticas manifestaram sintomas típicos da doença após 72 horas; não houve alteração nos tecidos inoculados com *Pseudomonas* saprófitas.

Vários estudos, usando diferentes combinações de hospedeiro-patógeno, têm sido efetivados em relação à hipersensibilidade (KLEMENT *et alii*, 1964; LELLIOT *et alii*, 1966) demonstrando que a maioria das *Pseudomonas* fitopatogênicas são aptas a induzir esta reação em combinações parassimbióticas. *Pseudomonas* saprófitas são inaptas, a não ser em condições extremas, como citam LOVREKOVICH e LOVREKOVICH (1970), ao obterem reação necrótica em plantas de fumo inoculadas com *P. fluorescens*, mantidas a 100% de umidade no escuro.

Exceção à regra é o trabalho de MISAGHI e GROGAN (1969) que, embora tenham separado *Pseudomonas* saprófitas

das patogênicas com base no teste de hipersensibilidade, evidenciaram apenas dois isolados de *Pseudomonas glycinea*, de quatro utilizados, induzindo reação necrótica em fumo. Porém, ao contrário destes resultados, SANDS *et alii* (1970), propondo uma taxonomia para as *Pseudomonas* fitopatogênicas, incluíram todos os isolados testados de *Pseudomonas glycinea* como aptos a induzirem reação de hipersensibilidade.

A indução da reação de hipersensibilidade em folhas de fumo é influenciada por vários fatores tais como a concentração do inóculo, temperatura, idade da cultura, umidade relativa e luminosidade. Dentro deste contexto, desde os primeiros trabalhos já se sabia que suspensões contendo menos de  $10^6$  cel/ml não manifestavam reação visível (KLEMENT, 1963). Contudo, estas reações ocorrem ao nível celular, tomando dimensões microscópicas, no tecido inoculado (TURNER e NOVACKY, 1974).

A temperatura tem grande importância na manifestação da hipersensibilidade, conforme constataram KLEMENT e GOODMAN (1967) ao não obterem reação em plantas inoculadas mantidas à temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ . Da mesma forma, exposição das plantas inoculadas a temperaturas tão baixas quanto  $16^{\circ}\text{C}$  ou menos podem inibir completamente a resposta à hipersensibilidade (COOK, 1971).

A idade da cultura bacteriana também influencia o tempo de aparecimento da reação. KLEMENT (1971) ilustra este fato ao observar que culturas com 1, 10 e 20 dias de

cultivo induziram reação após 8 - 9 h , 10 - 11 h e 12 - 13 h , respectivamente. Culturas jovens, que são metabolicamente mais ativas, induzem a reação mais cedo.

Ao contrário dos demais fatores, a luz não tem sido reconhecida como um fator ambiente crítico no desenvolvimento da reação de hipersensibilidade (KLEMENT e GOODMAN, 1967). Entretanto, LOZANO e SEQUEIRA (1970) demonstraram que, a luz é importante para o desenvolvimento da reação de hipersensibilidade por causa da síntese de substâncias, que induzem a reação, ser dependente da luz.

### 3.3 - MEIO DE TETRAZOLIUM

O uso biológico de sais de tetrazolium foi proposto inicialmente para testar a viabilidade de sementes e deve-se a transferência desta técnica, para a microbiologia, a FULTS *et alii* (1948) ao investigarem a relação entre patogenicidade de *Actinomyces scabies* e reação em meio de tetrazolium.

Os sais de tetrazolium são substâncias incolores, solúveis na água, que em contato com certas enzimas transformam-se em substâncias insolúveis vermelhas chamadas de formazam (MATTSON *et alii*, 1947). Assim, espécies de bactérias, e mesmo variantes dentro da espécie, exibem diferenças na coloração (HUDDLESON e BALTZER, 1950), indicando que o procedimento pode ser usado como um meio para a identificação destas

espécies e variantes. Isto também é verdadeiro para leveduras, como demonstraram PAGANO *et alii* (1958) diferenciando *Candida albicans* de outras leveduras.

Um problema relativamente frequente ocorrendo com culturas bacterianas preservadas em estoque é a alteração na patogenicidade, entre outros. Em vista disto, KELMAN (1954) propôs o uso do tetrazolium para a caracterização de eventuais mutantes apatogênicos. Usando suspensão bacteriana proveniente de culturas em estoque, inoculadas em meio contendo tetrazolium, foi possível identificar dois tipos de colônias de *Pseudomonas solanacearum* : uma delas, vermelha e outra branca com centro rosa, correspondendo ao tipo mutante pouco patogênico e ao tipo selvagem ou normal altamente patogênico, respectivamente.

Que esta não é uma reação idêntica para todas as bactérias ficou demonstrado por SMALE e WORLEY (1956) quando esses autores testaram, por este método, a patogenicidade em culturas estoque de *Pseudomonas phaseolicola* e *Xanthomonas phaseoli*. Colônias vermelhas foram relacionadas com alta patogenicidade enquanto colônias brancas foram fracamente patogênicas quando se considerou *Pseudomonas phaseolicola* ; considerando *Xanthomonas phaseoli* o grau de patogenicidade não foi relacionado com o tipo de coloração exibida no meio de tetrazolium. Não obstante, o método foi útil na obtenção de colônias altamente patogênicas de ambos os patógenos quando utilizados isolados recentes.

FRIEDMAN (1964) obteve de culturas de *Erwinia carotovora* com reduzida virulência, após cinco anos em esto - que, dois tipos de colônias: grandes vermelhas e pequenas ro - sas. Subculturas das primeiras colônias produziram grandes le - sões quando inoculadas no hospedeiro, enquanto subculturas da - daquelas rosas produziram pequenas lesões.

Três tipos principais de colônias foram detec - tadas por CARROL e LUKEZIC (1971) quando isolados de *Corynebac - terium insidiosum*, conservados por um ano sob três diferentes métodos, foram estriados sobre meio de tetrazolium. Testes conduzidos com inoculações no hospedeiro mostraram que os iso - lados derivados de colônias rosas foram altamente patogênicos, enquanto aqueles derivados de colônias vermelhas e verdes fo - ram fracamente patogênicos. Em contraste, Bordewick (CARROL e LUKEZIC, 1971), utilizando sete culturas altamente patogêni - cas e quatro fracamente patogênicas desta bactéria, não encon - trou diferença no tipo de colônia.

Em relação a *Pseudomonas glycinea*, sais de te - trazolium têm sido adicionados em diferentes meios de cultura (LEBEN *et alii*, 1968 ; LEBEN, 1972), principalmente como auxi - liar na identificação da bactéria, sem contudo aludir à colo - ração das colônias e à patogênica.

### 3.4 - BACTERIOCINAS

O estudo das bacteriocinas iniciou-se com a descoberta, em 1925, por Gratia (REEVES, 1965) de um antibiótico altamente específico produzido por uma linhagem de *Escherichia coli* e ativa contra linhagens da mesma espécie. O prosseguimento dos estudos com vários membros da família *Enterobacteriaceae* determinou a denominação de colicinas (FREDERICQ, 1948) para estes antibióticos.

Com a descoberta de que tais substâncias não eram limitadas aos organismos coliformes, mas também ocorria em grande número de bactérias gram-positivas e gram-negativas JACOB *et alii* (1953) propuseram o termo mais geral de "bacteriocinas", adotado até atualmente para designar antibióticos altamente específicos constituídos basicamente de proteínas e ativos principalmente contra isolados da mesma espécie produtora. A partícula de bacteriocina, uma vez absorvida pela bactéria causa a morte desta sem contudo haver propagação da bacteriocina, ao contrário do que acontece com os fagos (OKABE e GOTO, 1963).

À medida que tais substâncias foram sendo descobertas, empregaram-se termos mais específicos como colicina carotovoricina, fluocina e megacina, entre outros, para designarem as bacteriocinas produzidas por *Escherichia coli*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus megaterium*, respectivamente (REEVES, 1965).

Estudos têm demonstrado que, embora a atividade daquelas substâncias classificadas como bacteriocinas pareça residir em moléculas protéicas, a complexidade da estrutura é muito maior, chegando a assemelhar-se a bacteriófagos in completos e mostrar uma organização definida (BRADLEY, 1967). De fato, bacteriocinas dos isolados Ech 25 e Ech 33 de *Erwinia carotovora* parecem ser semelhantes à cauda de fagos, consistindo de uma parte central circundada por uma bainha contrátil (ECHANDI e MOYER, 1979).

Colicinas foram as primeiras bacteriocinas a serem estudadas em detalhes e sua classificação (FREDERICQ, 1957) foi feita considerando a especificidade de sua adsorção, em receptores específicos. Esta classificação foi complicada pela ocorrência frequente de isolados produzindo mais de uma bacteriocina e de mutantes resistentes a mais de um tipo de bacteriocina (REEVES, 1965). Outro critério taxonômico, baseado no seu peso molecular, foi utilizado por BRADLEY (1967). Esse autor dividiu a bacteriocina em dois grupos: o primeiro incluindo as que apresentavam baixo peso molecular, sensíveis a tripsina e termoestáveis e o segundo grupo incluindo aquelas de alto peso molecular, resistentes à tripsina e termolábeis. A maioria das bacteriocinas de bactérias fitopatogênicas são sensíveis ao calor ou resistentes à tripsina ou ambos, sugerindo serem de alto peso molecular. Não obstante, agrobacteriocina 1 produzida por *Agrobacterium tumefaciens* (STONIER, 1960) e bacteriocina 84 de *Agrobacterium radiobacter* (VIDAVER,

1976) são ambos de baixo peso molecular. A classificação de bacteriocinas em grupo, com base no espectro de atividade contra linhagens de uma mesma espécie, de espécies relacionadas e não-relacionadas e entre gêneros, foi usada por VIDAVER *et alii* (1972).

Linhagens bacteriocinogênicas, embora possuindo habilidade genética estável para produzir a bacteriocina, não o fazem todo o tempo ou sob todas as condições (REEVES, 1965). Alguns fatores que podem induzir ou interferir na síntese destas substâncias foram observadas por diversos pesquisadores. Assim, muitas das linhagens bacteriocinogênicas que produzem boas zonas de inibição em meio sólido, não produzem (REEVES, 1965) ou produzem menos quando em meio líquido (LITKENHOUS e LIU, 1967).

Foi demonstrado que a produção de colicina K é marcadamente afetada pela natureza do ânion do sal de amônia, usado como fonte de carbono, e que a glucose inativa ou inibe a síntese desta bacteriocina (MAYR-HARTING *et alii*, 1972). Neste sentido, YULE e BARRIDGE (1976) testaram vários meios para determinar o mais adequado observando que, na ausência de extrato de levedura, ocorriam títulos mais altos de termocina 10. A adição de peptona ao meio de cultura paralisou a atividade de bacteriocinas de *Pseudomonas syringae* como pôde observar DE VAY *et alii* (1968).

Em relação à idade da cultura, níveis máximos de termocina 10 ocorrem nos últimos estádios da fase estacio-

nária (YULE e BARRIDGE, 1976). Entretanto, para bacteriocinas produzidas por *Pseudomonas solanacearum*, CUPPELS *et alii* (1978) observaram que o título mais alto de bacteriocinas ocorria durante o final da fase exponencial de crescimento.

A produção de bacteriocina pode frequentemente ser incrementada pela indução com ultra-violeta ou certos produtos químicos. O tempo necessário para se obter a máxima produção é geralmente reduzido nestas condições. JACOB *et alii* (1952) foram os primeiros a constatar a utilidade da indução, com luz ultra-violeta, em *Escherichia coli* na produção de colicinas. Posteriormente, seguiram-se vários trabalhos como o de IVANOVICS (1962) que obteve um aumento em colicina E 2 após o tratamento com ultra-violeta, em relação à quantidade produzida em condições normais.

Mais recentemente, CUPPELS *et alii* (1978), adicionando mitomicina C ou cloranfenicol à culturas de *Pseudomonas solanacearum*, não lograram incremento no título da bacteriocina, a não ser pelo uso da luz ultra-violeta (o título foi elevado de 100 para 1.000 UA ml<sup>-1</sup>). Já em *Erwinia chrysanthemi*, submetendo as linhagens Ech 25 e Ech 33 à luz ultra-violeta e mitomicina C, ECHANDI e MOYER (1979) obtiveram incremento na produção de bacteriocina para ambos os tratamentos, mas com melhores resultados através da irradiação. Em contraposição, tratamentos com irradiação de ultra-violeta ou mitomicina C foram ineficazes para incrementar o espectro das culturas bacteriocinogências de *Bordetella pertussis* (LITKENHOUS

e LIU, 1967) ; *Bacillus stearothermophilus* linhagem NU - 10 (YULE e BARRIDGE, 1976) e de *Corynebacterium michiganense* (ECHANDI, 1976).

Condições de temperatura também afetam a produção de bacteriocina. GILLES e GOVAN (1966) e GOVAN e GILLES (1969) observaram uma maior produção desta substância em *Pseudomonas aeruginosa* a temperaturas abaixo do ótimo para o crescimento. Esta exigência de temperatura um pouco inferior ao ótimo para o desenvolvimento da colônia bacteriana foi também constatada para *Pseudomonas glycinea* , *Pseudomonas phaseolicola* e *Pseudomonas syringae* em que a produção de bacteriocina foi melhor a 20<sup>o</sup> - 24<sup>o</sup>C do que a 28<sup>o</sup> - 32<sup>o</sup>C (VIDAVER *et alii* , 1972) e a 30<sup>o</sup>C para *Pseudomonas solanacearum* cujo ótimo para a bactéria é 32<sup>o</sup>C , conforme CUPPELS *et alii* (1978). Para espécies de *Corynebacterium* GROSS e VIDAVER (1979) demonstraram que, embora a média ótima para o crescimento seja 25<sup>o</sup>C , houve aumento na produção a 20<sup>o</sup>C para a maioria das bacteriocinas.

De um modo geral, bacteriocinas de bactérias fitopatogênicas têm sido pouco estudadas (OKABE e GOTO, 1963) , sendo inicialmente demonstradas em um estudo de 14 *Pseudomonas* fitopatogênicas abrangendo 12 espécies (HAMON *et alii* , 1961).

GARRETT *et alii* (1966) observaram o comportamento de 45 isolados de *Pseudomonas syringae* frente a oito isolados indicadores e estabeleceram as diferenças existentes

na produção de bacteriocinas por isolados de diferentes hospedeiros. Isolados de *P. syringae* de pereira mostraram atividade de contra isolados de citrus e vice-versa. Em contraposição, VIDAVER *et alii* (1972) observaram que diferentes isolados de *P. syringae* foram tão heterogêneos com respeito a grupos de bacteriocinas e origem da planta hospedeira que a tipificação de isolados desconhecidos seria de limitado valor na determinação do hospedeiro de origem. Também observaram que 100% dos isolados de *P. syringae* produziram bacteriocinas, 8% de *P. phaseolicola* e 55% de *P. glycinea*.

Estes últimos dados contrastam com os resultados de HAMON *et alii* (1961) já que estes autores não encontraram produção de bacteriocina em *Pseudomonas syringae* e *Pseudomonas glycinea*.

ECHANDI (1976) classificou 55 linhagens bacteriocinogênicas, dentre 96 isolados de *Corynebacterium michiganense*, em quatro grupos, permitindo a diferenciação de dez tipos de bacteriocinas, os quais incluíam 96% dos isolados; não houve correlação entre o tipo de bacteriocina e virulência em plantas.

Várias espécies fitopatogênicas de *Corynebacterium* foram estudadas, mais recentemente, por GROSS e VIDAVER (1979) tendo a maioria, 85% dos isolados, produzido bacteriocinas. Algumas linhagens de *Corynebacterium nebraskense*, *Corynebacterium michiganense*, *Corynebacterium insidiosum* e *Corynebacterium flaccunfaciens* produziram duas bacteriocinas.

Muitas das bacteriocinas inibiram linhagens de outras espécies confirmando observações de sensibilidade à bacteriocina de *Corynebacterium michiganense* por *Corynebacterium insidiosum* e vice-versa, feitas por NELSON e SEMENIUK (1964). Tal antagonismo é comum para bacteriocinas produzidas por bactérias gram-positivas (TAGG *et alii*, 1976).

Dezesseis dos dezoitos isolados de *Erwinia chrysanthemi* produziram bacteriocinas, sendo possível agrupá-los em cinco tipos de acordo com a reação frente à três linhagens bacteriocinogênicas, com o que ECHANDI e MOYER (1979) ilustraram o possível uso de bacteriocinas na tipificação e classificação infra-subespecífica desta bactéria.

Os resultados obtidos com 17 isolados de *Xanthomonas campestris* de diferentes locais e diferentes variedades de *Brassica oleracea* indicaram que 47% dos isolados eram linhagens bacteriocinogênicas, não havendo porém relação entre a produção destas substâncias e o local ou variedade de onde a bactéria foi isolada (SANTOS, 1979).

Na utilização de bacteriocina como agente de controle, tem-se verificado dramático decréscimo na doença causada por *Agrobacterium tumefaciens* (cerca de 99% de controle) (KERR, 1972 e HTAY e KERR, 1974) quando *Agrobacterium radiobacter* produtora da bacteriocina 84, é inoculada em sementes ou raízes dos hospedeiros. A ação desta bacteriocina é preventiva e não curativa (MOORE, 1979).

Estudos preliminares indicaram que a produção de bacteriocina por um mutante não-patogênico de *Corynebacterium michiganense* pode controlar o cancro bacteriano do tomateiro quando as linhagens bacteriocinogênicas e patogênicas são misturadas no inóculo ou quando pulverizações com a linhagem bacteriocinogênica precede àquela com o patógeno, conforme os resultados de ECHANDI (1975).

VIDAVER (1976), em sua revisão sobre o controle de bactérias fitopatogênicas através de bacteriocinas, comenta que as pesquisas neste campo deverão ser expandidas uma vez que estas substâncias possuem o mais desejável dos atributos necessários aos agentes de controle, ou seja, a especificidade de ação contra o organismo em questão.

### 3.5 - SEROLOGIA

A partir do início deste século, a serologia começou a ser utilizada na microbiologia, tendo um papel importante na identificação e classificação de microorganismos, uma vez que sua sensibilidade é superior à de, praticamente, todos os métodos químicos e bioquímicos utilizados com esta finalidade (SEELIGER, 1968).

Após vários estudos sobre serologia de bactérias, SHATTOCK (1955) afirmou estar convencido de que estas técnicas poderiam, com vantagem, ser mais genericamente usadas

no estudo sistemático de todos os grupos de microorganismos , dada a alta especificidade das reações serológicas. Atualmente as técnicas serológicas são usadas para purificação, determinação da estrutura, função e identificação de compostos específicos (SHAAD, 1979).

O uso dos métodos serológicos em relação às doenças de plantas, em geral, tem sido negligenciado, principalmente no campo da micologia (FIGUEIREDO, 1972). Na fitobacteriologia, uma das causas do pouco interesse, provavelmente, deve-se às falhas do passado, com o emprego dos testes de aglutinação e precipitação na diferenciação entre espécies, devido à ocorrência de reações não-específicas.

A primeira publicação a respeito do uso de serologia para identificar uma bactéria fitopatogênica foi feita em 1918 quando Jensen mostrou que linhagens *Agrobacterium tumefaciens* oriundas da Dinamarca poderiam ser diferenciadas das linhagens oriundas dos Estados Unidos pelos testes de aglutinação (SHADD, 1979).

GOLDSWORTHY (1928) ao testar a produção de antissoro contra duas espécies fitopatogênicas, *Pseudomonas cerasus* e *Bacterium maculicolum* , concluiu que as reações ocorriam tão satisfatoriamente quanto entre as bactérias patogênicas a animais, tendo as espécies diferido grandemente na intensidade de indução de anticorpos, possivelmente devido aos produtos tóxicos que elas elaboram.

Em 1948, Berquist e Elrod obtiveram antissoro para suspensão de células fervidas a 100°C ou tratadas com etanol absoluto conseguindo assim diferenciar facilmente espécies de *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter*, *Agrobacterium rubi* e *Agrobacterium rhizogenes* (SHAAD, 1979).

A falha em diferenciar isolados de *Erwinia carotovora*, *Erwinia atrosséptica* e *Erwinia aroidea* pelo método de aglutinação levou ELROD (1941) a sugerir que a reação cruzada poderia ser resultado de antígenos flagelares comuns presentes na célula intacta usada na imunização. Evidências da interferência de componentes comuns foram constatadas nos estudos seguintes de ELROD e BRAUN (1947) com vários isolados de *Xanthomonas* spp. Quando células vivas foram usadas para imunização resultava em aglutinação cruzada entre os isolados de diferentes espécies; entretanto, com a remoção do material mucóide das células usadas para a obtenção do antissoro, a reação cruzada foi eliminada.

MUNOZ *et alii* (1949), usando um grupo representativo de espécies de *Pseudomonas* para determinar a relação serológica entre elas, pôde separar tanto *Pseudomonas cavie*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas graveolens*, *Pseudomonas mucidolens* e *Pseudomonas pavonacea* que são facilmente diferenciáveis por métodos bioquímicos, como também *Pseudomonas ovalis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mildenbergii*, *Pseudomonas putida* que não são facilmente diferenciáveis por métodos de rotina de laboratório. Apesar disto, FRIEDMAN (1953) tes-

tando 14 espécies de *Pseudomonas*, entre as quais *Pseudomonas fluorescens*, colocou limitações no uso da diagnose serológica por haver reação cruzada entre sete espécies.

Foi com a introdução do teste de dupla difusão em agar de Ouchterlony, em 1948 (SHAAD, 1979), que os resultados serológicos puderam ser melhor interpretados, com possibilidades de se separar isolados da mesma espécie em serotipos (LUCAS e GROGAN, 1969). Ao nível de raças, MORTON *et alii* (1966) conseguiram obter antissoro específico que tornou possível a identificação serológica das raças 1, 2 e 3 de *Pseudomonas solanacearum*; as três raças mostraram relação serológica complexa, porém as raças 2 e 3 parecem ser mais relacionada entre si do que com a raça 1. Entretanto, com as raças 1 e 2 de *Pseudomonas phaseolicola* GUTHRIE (1968) não encontrou diferenças serológicas que as pudessem diferenciar.

Espécies fitopatogênicas de *Pseudomonas phaseolicola*, *Pseudomonas mori*, *Pseudomonas tomato* e *Pseudomonas lachrymans* mostraram vários antígenos em comum, mas cada qual tinha pelo menos um antígeno específico; a eliminação das linhas de precipitação devido aos antígenos comuns foi conseguida pelo aquecimento das células por uma hora a 100°C (LUCAS e GROGAN, 1969). A ocorrência de antígenos comuns e a eliminação destes pelo aquecimento foram também observados por OTTA e ENGLISH (1971) em serotipos de *Pseudomonas syringae* que apresentou antígenos relacionados ou idênticos a *Pseudomonas antirrhini*, *Pseudomonas maculicola*, *Pseudomonas mori*, *Pseudo*

*monas pisi* , *Pseudomonas savastanoi* , *Pseudomonas tomato* e *Pseudomonas viridiflava*. Outros autores, como TAYLOR (1972) e MAZZUCHI (1975), constataram a ocorrência de antígenos comuns entre espécies de *Pseudomonas* fitopatogênicas, principalmente envolvendo *Pseudomonas syringae*.

Antissoro produzido contra 6 isolados de *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* , oriundos de batata, foram serologicamente idênticos entre si e diferenciáveis de *E. carotovora* var. *atroseptica* e *E. carotovora* var. *carotovora*, oriundas da beterraba e batata, respectivamente, segundo as observações de STANGHELLINI *et alii* (1977).

SHEKHATAWAT e CHAKRAVARTI (1977), trabalhando com testes serológicos para encontrar diferenças antigênicas entre isolados de *Xanthomonas* spp. , *Pseudomonas* spp. , *Erwinia* sp. , *Corynebacterium* sp. e *Agrobacterium* sp observaram não haver relação serológica destas com *Xanthomonas vesicatoria* , estando a especificidade confinada ao nível genérico e em alguns casos ao nível de espécie da bactéria estudada.

YAKRUS e SHAAD (1979) determinaram a relação serológica entre 27 isolados de *Erwinia chrysanthemi* de 18 hospedeiros diferentes, agrupando-os em quatro serotipos, não havendo relação entre estes e o hospedeiro de origem.

As linhagens de *Erwinia carotovora* , dos serogrupos I , III , V e XVIII foram também investigadas quanto à sensibilidade a bacteriocinas produzidas por seis linhagens.

As linhagens da var. *atroseptica* (serogrupos I e XVIII) e algumas linhagens da var. *carotovora* (serogrupo III) foram sensíveis a uma bacteriocina ; as linhagens do serogrupo I e III, mas não do serogrupo XVIII foram sensíveis a uma segunda bacteriocina e as linhagens do serogrupo V foram sensíveis a uma bacteriocina diferente daquelas para os demais serogrupos (DEBOER *et alii* , 1979).

No que concerne à serologia com *Pseudomonas glycinea* , foram encontradas referências apenas indiretas, como no trabalho de TAYLOR (1972), que testando a especificidade do antissoro de *Pseudomonas pisi* obteve reações cruzadas com *Pseudomonas glycinea*. Posteriormente, SHAAD (1979) relatou a ocorrência de reação cruzada de *Pseudomonas lachrymans* com *Pseudomonas glycinea*.

### 3.6 - RESISTÊNCIA A DROGAS

O desenvolvimento de resistência a antibióticos foi primeiramente estudado em bactérias de interesse médico e as revisões de BRYSON e SZYBALSKI (1957) , SCHNITZER e GRUNBERG (1957) , WATANABE (1972) , HELINSKI (1973) e TRABULSI (1973) mostram a complexidade do assunto.

Com relação a bactérias fitopatogências, tanto a atividade dos antibióticos como o desenvolvimento e o mecanismo da resistência têm sido pesquisados com menor frequência.

O primeiro relato do uso de antibióticos contra uma bactéria fitopatogênica foi feito por BROWN e BOYLE (1944) no controle bem sucedido de *Agrobacterium tumefaciens*, com penicilina, abrindo o campo da terapia com drogas deste tipo. A eficácia dos antibióticos foi suportada, posteriormente, pelos testes de GILLIVER (1946) com a ação de 13 drogas contra bactérias e fungos.

Teste "in vitro" contra bactérias fitopatogênicas é o primeiro passo em programas de controle de fitobacterioses com antibióticos. Neste sentido, as pesquisas têm-se dirigido principalmente ao gênero *Xanthomonas*. THIRUMALACHAR *et alii* (1956) testaram, por difusão em meio sólido, as concentrações de 20 µg/ml de estreptomicina, 50 µg/ml de penicilina e 60 µg/ml de aureomicina, terramicina e cloranfenicol contra 32 espécies de *Xanthomonas* havendo com exceção da penicilina, inibição de todas as espécies pelos antibióticos. Em testes de laboratório com vários antibióticos ECHEGARAY (1958) mostrou que a estreptomicina sozinha, ou combinada com outra substância foi a droga mais eficiente para o controle de bactérias fitopatogênicas.

MEHTA *et alii* (1959), observando a ação de vancomicina sobre 30 espécies de bactérias, verificaram que o espectro antibacteriano desta substância envolvia tanto bactérias gram-positivas como gram-negativas, em níveis variáveis entre gêneros e espécies, sendo o gênero *Pseudomonas* relativamente resistente.

Recentemente tem sido registrado que algumas bactérias resistentes a antibióticos foram isolados de plantas doentes no campo (IIDA, 1975). Testes desenvolvidos "in vitro" já haviam demonstrado esta probabilidade. Ao estudar o comportamento de *Xanthomonas campestris* com respeito a três antibióticos diferentes AZEVEDO (1961) observou que, para a estreptomicina, colônias resistentes apareceram a 40 µg/ml; do se mais alta empregada, comportando-se conforme o modelo clássico de "um passo". O incremento da resistência em relação à linhagem original foi de 128 vezes para este antibiótico, não se verificando resistência cruzada.

Algumas observações quanto a capacidade patogênica das bactérias ser alterada ao adquirirem resistência a antibióticos parecem contraditórias. Mutantes resistentes *Xanthomonas phaseoli* que se tornaram dependentes de estreptomicina, não tiveram sua patogenicidade afetada (QUADLING, 1960). Em outros casos, como em *Erwinia amylovora* (SHAFFER e GOODMAN, 1962), linhagens resistentes tornaram-se apatogênicas, enquanto que as patogênicas permaneceram sensíveis. LEMOS (1969) obteve mutantes resistentes a 64 µg/ml de estreptomicina em *Xanthomonas campestris*, observando que esses mutantes foram mais patogênicos que a linhagem sensível.

Na prática, o controle eficiente importa no conhecimento do mecanismo genético da droga (AZEVEDO, 1973) e seu tempo de eficácia deve ser identificado antes de sua co-

mercialização. Neste sentido, BERGAMIN FILHO *et alii* (1975) definiram três grupos de drogas de acordo com a modificação na taxa de crescimento do mutante resistente em relação à linha gem original na ausência da droga: forte, fraca e neutra.

Há várias revisões publicadas mais recentemente sobre o uso de antibióticos em doenças de plantas como a de DEKKER (1963) e PRADO FILHO (1975).

A literatura a respeito de resistência a antibióticos em *Pseudomonas glycinea* é escassa. LACY e LEARY (1975) e PANOPOULOS *et alii* (1975) conseguiram transferir o plasmídeo RP 1 de *Pseudomonas aeruginosa* para *Pseudomonas glycinea*. Este plasmídeo confere uma resistência aos antibióticos carbenicilina, tetraciclina, canamicina e neomicina. Esses últimos autores constataram que nem a hipersensibilidade em fumo e nem a patogenicidade haviam sido afetadas pela herança do plasmídeo.

## 4 - MATERIAIS E METODOS

### 4.1 - LOCAL DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada nos laboratórios e casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, em Piracicaba, SP.

### 4.2 - ORIGEM E COLETA DOS ISOLADOS

Os isolados de *Pseudomonas glycinea*, alistados na Tabela 1, são provenientes de três estados e diversas localidades.

TABELA 1 - Relação dos isolados de *P. glycinea* e suas respectivas procedências

Isolados	Localidade / Estado
S	Londrina, PR
B0 <sub>1</sub>	Campo Mourão, PR
B0 <sub>4</sub>	Osório, RS
B0 <sub>7</sub>	Passo Fundo, RS
B <sub>13</sub>	Campinas, SP
B <sub>69</sub>	Cambé, PR
B <sub>71</sub>	Marechal Cândido Rondon, PR
Pg <sub>1</sub>	Campinas, SP
Pg <sub>2</sub>	Candelária, RS
Pg <sub>3</sub>	Cambará, PR
Pg <sub>4</sub>	Londrina, PR
Pg <sub>5</sub>	Passo Fundo, RS
Pg <sub>6</sub>	Londrina, PR

Folhas e folíolos que apresentavam lesões características do Crestamento Bacteriano foram coletados e guardados em saco plástico com algodão umedecido, quando o isolamento era procedido dentro de poucos dias após a coleta. Pa-

ra intervalos entre coleta e isolamento mais longas folhas e folíolos afetados foram colocados entre folhas de papel jornal e ligeiramente prensados.

## 4.3 - MEIOS DE CULTURA E ANTIBIÓTICOS

### 4.3.1 - MEIOS DE CULTURA

Os seguintes meios de culturas foram utilizados:

Meio de cultura para isolamento e repicagem:

Meio de King B (KING *et alii*, 1954)

Proteose peptona nº 3 .....	20,0 g
Glicerol .....	12,0 ml
$K_2HPO_4$ (anidro) .....	1,5 g
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ .....	1,5 g
Agar .....	15,0 g
Água destilada .....	1000,0 ml

Meio de cultura para observar presença de arginina dihidrolase (THORNLEY, 1960)

Peptona .....	1,0 g
Cloreto de sódio .....	5,0 g
$K_2HPO_4$ .....	0,3 g

Vermelho de fenol .....	0,01 g
L (+) - Arginina HCl .....	10,0 g
Agar .....	3,0 g
Água destilada .....	1000,0 ml
pH .....	7,2

Meio de cultura para a produção de bacteriocina:

Meio PCG (CUPPELS *et alii*, 1978)

Meio sólido:

Peptona .....	10,0 g
Glucose .....	10,0 g
Caseína ácida .....	1,0 g
Agar (Difco) .....	15,0 g
Água destilada .....	1000,0 ml

Meio líquido:

A mesma composição do meio sólido, exceto agar

Meio semi-sólido:

A mesma composição do meio sólido, usando somente 0,7% de agar

Meio de tetrazolium para diferenciação de colônias patogênicas e apatogênicas (KELMAN, 1954)

Peptona .....	10,0 g
Caseína hidrolisada (Difco) .....	1,0 g
Glucose .....	5,0 g

Agar .....	17,0 g
Tetrazolium .....	0,05 g
Água destilada .....	1000,0 ml

### 4.3.2 - ANTIBIÓTICOS

Foram utilizados quatro antibióticos, preferencialmente aqueles usados em formulações empregadas na agricultura. Os antibióticos e os respectivos laboratórios que os produzem são:

Kasugamicina 2% (kg) - Hokko Chemical Industry Co. Ltda.

Sulfato de Estreptomicina (Str) - Lafergs

Terramicina (Tm) - Pfyzer

Tetraciclina (Tc) - Laborterápica Bristol S/A

## 4.4 - ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CONSERVAÇÃO DO PATÓGENO

### 4.4.1 - ISOLAMENTO

O isolamento foi feito com base na metodologia descrita por FERREIRA (1978). O processo direto foi empregado quando o material coletado, folhas ou folíolos, apresentavam lesões novas. Pequenos fragmentos do tecido apresentando anasarca são cortados e desinfectados em álcool e sublimado corrosivo (1 : 1000) por um minuto e lavados em seguida em água

estéril. Sobre uma lâmina escavada e flambada é colocada uma gota de água esterilizada, juntamente com fragmentos do tecido infectado. Estes fragmentos são finamente cortados de modo a proporcionar intenso fluxo de bactérias para a gota de água. Cerca de dois minutos após esta gota é transferida, com auxílio de alça de platina flambada, para placas de Petri (100 mm x 20 mm) contendo 20 ml de meio de King. Procedese, então, à diluição da suspensão pelo método de estrias. As plantas inoculadas são colocadas em estufa a 26°C, fazendo-se a repicagem para tubos com meio de cultura inclinado, cerca de 36 - 48 horas após.

O meio de cultura é preparado no mesmo dia, vertendo-o a 45°C em placas de Petri. Depois de solidificado o meio, o excesso da umidade é eliminado entreabrindo-se as placas em câmara asséptica de ar contínuo, por 45 minutos.

Em outro processo de isolamento direto utilizado, as folhas com sintomas foram colocadas, com a superfície abaxial voltada para cima, em placas de Petri, com algodão umedecido, por uma noite a 26°C. Intensa exudação bacteriana, é constatada no dia seguinte; com auxílio de pipeta de Pasteur, coleta-se este exudado transferindo-o para uma gota de água estéril e diluindo-a sobre a superfície do meio de cultura.

Quando o material coletado apresentava lesões necróticas mais velhas empregou-se o método indireto para isolamentos. Pedacos do tecido foliar contendo lesões foram ma-

cerados em almofariz com 5 ml de água. Cerca de 20 minutos a p<sup>o</sup>s, o sobrenadante foi coletado e mantido em tubo de ensaio para posterior uso. Plantas do cultivar Santana suscetível ao patógeno foram mantidas previamente em câmara úmida, utilizando-se para tal sacos plásticos (340 mm x 230 mm) ; as folhas primárias ou folíolos recentemente abertos foram encharcados com água em uma área circular de 6,0 mm de diâmetro. O sobrenadante foi transferida para esta área encharcada, com auxílio de um cotonete, de maneira a não causar ferimentos na superfície da folha. Ap<sup>o</sup>s inoculadas, manteve a câmara úmida por mais 48 horas em casa de vegetação. Ap<sup>o</sup>s 6 - 7 dias, os sintomas já estão visíveis procedendo-se ao isolamento pelo método direto anteriormente descrito.

O encharcamento do tecido foliar é obtido com auxílio de um atomizador De Villbis nº 114 acoplado a um compressor marca Primar. A pressão utilizada é de 10 - 15 PSI.

#### 4.4.2 - IDENTIFICAÇÃO

Para identificação da bactéria foram feitos os testes morfológicos e bioquímicos segundo a chave descritas por BRADBURY (1970): coloração de gram, morfologia celular, teste para esporos, produção de fluorescência em meio de King e teste de oxidase. Para reforço destas provas, fez-se o teste para presença de arginina dihidrolase e patogenicidade.

O teste de oxidase foi executado da seguinte maneira: discos de papel filtro com 13 mm de diâmetro foram embebidos em solução de 1% de tetrametil-p-fenilene diamina dihidroclorido e secados ao ar. No momento do uso, colocou-se uma gota de água estéril sobre o papel de filtro de modo a umedecê-lo ; uma pequena quantidade da cultura de bactérias com 48 horas foi estriada sobre o disco, obtendo-se a resposta pela coloração apresentada.

O teste de patogenicidade foi feito em plantas de soja do cultivar Santana, preparadas como descrito no item 4.4.1. Uma suspensão de bactérias na concentração de aproximadamente  $3,5 \cdot 10^6$  cel/ml foi transportada para a área encharcada com auxílio de um cotonete. Esta concentração foi obtida, baseada em testes de diluição em placa, auxiliado pelo colorímetro.

O inóculo utilizado para os testes de identificação foram sempre provenientes de subculturas das bactérias repicadas para tubos com meio de cultura inclinado e incubados a  $26^{\circ}\text{C}$  por 48 horas.

#### 4.4.3 - CONSERVAÇÃO DO PATOGENO

No tecido foliar:

Os isolados foram conservados em folhas primárias ou folíolos de folhas trifolioladas após comprovação da

patogenicidade. Estas folhas foram colhidas cinco a sete dias após a inoculação, quando o tecido infectado apresentava-se translúcido. As folhas, uma vez desidratadas, eram conservadas à temperatura de 4 - 5°C , conforme FERREIRA (1978).

Em óleo mineral:

Tubos contendo 4 ml de meio de King, previamente seco, foram inoculados com os isolados e após crescimento a 26°C por 48 horas, adicionou-se 1 ml de óleo mineral esterilizado. Os tubos assim preparados foram mantidos em geladeira a 4 - 5°C.

#### 4.5 - DETECÇÃO DA PATOGENICIDADE ATRAVÉS DA HIPERSENSIBILIDADE EM FOLHAS DE FUMO

Para a detecção das colônias patogênicas desenvolvidas em meio de cultura, procedeu-se de acordo com a técnica descrita por KLEMENT (1963) com respeito à infiltração da suspensão bacteriana nas folhas de fumo. Plântulas de soja artificialmente inoculadas com 13 isolados de *P. glycinea*, mantidas em casa de vegetação e apresentando lesões necróticas, foram as escolhidas. Procedeu-se ao isolamento pelo método direto, descrito no ítem 4.4.1. Após 48 horas de crescimento das colônias, uma placa de cada isolado foi observada sob luz ultra-violeta para a produção de fluorescência. Cinco colônias de cada placa que apresentavam fluorescência foram trans

feridas para tubo com meio de King inclinado e usadas, após crescimento, como inóculo para o prosseguimento do teste.

Plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) do cultivar Virginia Coker 254, crescidas sob condições de casa de vegetação, foram utilizadas no experimento.

Cada uma das culturas com 48 horas foram suspensas em 10 ml de água estéril, com aproximadamente 10 cel/ml, ajustadas para esta concentração através do colorímetro. A suspensão foi injetada no espaço intercelular da folha de fumo, com auxílio de uma seringa estéril provida de agulha nº 30 - 8, através das nervuras laterais das folhas mais velhas. Cerca de 12 - 24 horas após, sob condições de casa de vegetação, foi observada a reação da planta. Teste de patogenicidade foram realizados com os isolados ensaiados, para confirmar as reações obtidas em folha de fumo.

#### 4.6 - RELAÇÃO ENTRE PATOGENICIDADE E MORFOLOGIA DE COLÔNIAS DE *Pseudomonas glycinea* EM MEIO DE TETRAZOLIUM

Dois isolados de *Pseudomonas glycinea* (B<sub>13</sub> e B<sub>69</sub>) foram usados no presente estudo, provenientes de cultura-estoque em óleo, conforme o ítem 4.4.3. Ambas as culturas possuíam cinco meses de idade. O método empregado foi o preconizado por KELMAN (1954).

Para o preparo do meio (item 4.3.1) convenientes alíquotas de uma solução a 1% de tetrazolium foram adicionadas assepticamente ao meio fundido a 45°C para obter a concentração desejada do sal, antes de vertê-lo em placas. Subculturas das bactérias em estoque, desenvolvidas em meio de King por 48 horas, foram suspensas em água estéril de tal modo que, quando 0,1 ml da suspensão era colocada sobre o meio de tetrazolium, eram obtidas cerca de 50 - 100 colônias. Três colônias representativas de cada isolado foram transferidas para meio de cultura em tubo e usadas para o preparo de uma suspensão  $10^6$  cel/ml. A patogenicidade de cada colônia-tipo foi testada em plantas de soja do cultivar Santana, mantidas em câmara úmida como cita o item 4.4.1. Uma área circular uniforme de tecido encharcado com cerca de 6 mm de diâmetro foi conseguida colocando-se um anteparo com orifício de mesmo diâmetro entre o folíolo e o atomizador. Com auxílio de cotone-te, a suspensão bacteriana foi transportada para o tecido encharcado. As plantas foram mantidas em câmara úmida por mais 48 horas em casa de vegetação. A suspensão de cada colônia-tipo foi inoculada no folíolo central das plantas trifolioladas com cerca da metade do seu tamanho máximo. Inoculou-se três plantas por vaso, com quatro repetições. Leituras foram feitas medindo-se o diâmetro da área que se apresentava clorótica, após 12, 20 e 30 dias de inoculação.

#### 4.7 - RELAÇÃO ENTRE O TIPO DE COLÔNIA EM MEIO DE TETRAZOLIUM E HIPERSENSIBILIDADE EM FOLHAS DE FUMO

Com o propósito de se determinar a viabilidade da técnica da hipersensibilidade em detectar alterações na capacidade patogênica dos isolados, foram empregados os isolados B<sub>04</sub>, B<sub>13</sub>, B<sub>69</sub>, Pg<sub>2</sub>, Pg<sub>3</sub> e Pg<sub>5</sub>, procedendo-se como no ítem 4.6 para a obtenção de subculturas e posterior cultivo destas em meio de tetrazolium. Três colônias, em número variável por isolado quanto ao tipo de coloração apresentada em meio de tetrazolium, foram repicadas para meio de King. Após 48 horas de desenvolvimento neste meio, as colônias de centro rosa tidas como normais e colônias inteiramente vermelhas tidas como fracamente patogênicas, foram suspensas em água-estéril a uma concentração de 10<sup>8</sup> cel/ml e então inoculadas em folhas de fumo do cultivar Virginia Coker 254 conforme já descrito no ítem 4.5.

Observações quanto à reação de hipersensibilidade foram feitas a partir de doze horas após a inoculação à 72 horas.

#### 4.8 - PRODUÇÃO DE BACTERIOCINA

Os procedimentos de VIDAVER *et alii* (1972) e os meios de cultura utilizados por CUPPELS *et alii* (1978) foram usados para testar a produção de bacteriocinas em meio sô

lido. Tubos de 7,5 mm x 1,2 mm contendo 2,0 ml de meio P C G líquido foram inoculados com 13 isolados de *Pseudomonas glyci*nea ; após incubação a 26°C por 48 horas as culturas foram repicadas para placas de Petri contendo 20 ml de meio P C G sôlido e novamente incubadas por 48 horas a 24°C. A transferência dos isolados para as placas foi feita por intermêdio de um replicador multi-alça, o que permitiu colocar de modo uniforme todos os isolados sobre a superfície do meio. Ao final do período de incubação, as placas foram invertidas, colocando - se, na tampa de cada uma delas, 1,5 ml de clorofôrmio. A exposição ao vapor de clorofôrmio foi mantida durante 45 minutos, quando então, entreabriram-se ligeiramente as placas em câmara assêptica de ar contínuo por mais 60 minutos até evaporação total do clorofôrmio.

Sobre o meio de cultura destas placas foram distribuídos 4,0 ml de meio P C G semi-sôlido a 45°C , aos quais haviam sido adicionados 0,1 ml de cada um dos isolados previamente inoculados em meio P C G líquido por 36 horas. Obteve-se assim, uma película homogênea sobre a cultura inferior. As placas foram então incubadas a 24°C por 48 horas seguidas de leitura do halo de inibição. Cada isolado foi testado como produtor de bacteriocinas contra os demais.

A indução da produção de bacteriocina por luz ultra-violeta também foi testada. O mesmo procedimento foi executado: as placas com os isolados (36 horas de incubação),

foram abertas em ambiente asséptico escuro e irradiadas com luz ultra-violeta (comprimento de onda predominantemente de 345 nanômetros, marca Mineralight, mod. nº R 52, Ultra-Violet Prod. Inc., San Gabriel, California, USA) durante 10 segundos a 15 centímetros da fonte luminosa. As placas irradiadas foram envolvidas em papel laminado e novamente incubadas por mais 12 horas a 24°C, antes de serem expostas ao vapor de clorofórmio, como já descrito anteriormente.

#### 4.9 - SEROLOGIA

##### 4.9.1 - PREPARO DOS ANTÍGENOS

Isolados de *Pseudomonas glycinea* e saprófitas fluorescentes foram transferidos para placas de Petri contendo 20 ml de meio de King e cultivadas a 26°C por 48 horas. Após o desenvolvimento, as colônias foram removidas do substrato por raspagem com alça de platina e transferidas para tubos contendo 10 ml de uma solução salina (NaCl 0,85%) previamente esterilizada. As bactérias foram então lavadas por duas vezes em igual volume de solução salina através de centrifugação (Centrífuga Sorvall SS-4) a 12.000 gravidades por 10 minutos, e a parte decantada resuspensa em 5 ml de solução salina tamponada (NaCl 0,85% ;  $K_2HPO_4$  -  $KH_2PO_4$  0,01 M ; pH 7,2).

Esta suspensão foi então colocada em almofariz de porcelana contendo 1 ml de areia (peneira 40 mesh) e levada ao congelador. Após a solidificação, procedeu-se à maceração das células bacterianas com auxílio de um bastão, pressionando-se o solidificado com movimentos rotatórios até obter-se a sua liquefação, quando era novamente posto no congelador. Esta operação foi repetida quatro vezes sendo, em seguida, centrifugada a 3.000 gravidades durante cinco minutos. A parte decantada foi eliminada, coletando-se o sobrenadante em frascos e armazenando-o em congelador. Uma gota de merthiolate (1 : 1000) foi adicionada ao sobrenadante para preservação asséptica (NAMEKATA, 1971).

A areia utilizada como abrasivo foi mantida em solução de HCl 0,5 N por dois dias, lavada em água estéril e seca ao ar.

Para a obtenção dos antígenos fervidos, o procedimento no cultivo, remoção e lavagem das bactérias é o mesmo já descrito. Após a suspensão destes em 5 ml de salina tamporada foram levados para aquecimento a 100°C durante dois minutos em bico de Bunsen. Após o resfriamento da suspensão adicionou-se uma gota de merthiolate, guardando-a em frascos no congelador até o momento do uso.

Além dos isolados de *Pseudomonas glycinea* e saprófitas fluorescentes, outras bactérias foram empregadas como teste da especificidade do antissoro e preparadas nos moldes já descritos anteriormente. Estas são: *Pseudomonas ru-*

*briligneans* , *Pseudomonas alboprecipitans* , *Pseudomonas tomato* e *Xanthomonas vesicatoria*.

Por conveniência, os antígenos foram codificados como: AGg - *P. glycinea* ; AGs 1 , 2 e 3 - bactérias saprófitas ; AGr - *P. rubriligneans* ; AGa - *P. alboprecipitans* ; AGt - *P. tomato* e AGx - *X. vesicatoria*.

A concentração das suspensões foi de  $10^9$  cel/ml obtidas com auxílio do colorímetro.

#### 4.9.2 - OBTENÇÃO DO ANTÍSSORO

Para obtenção do antíssoro, foi utilizado um isolado de *Pseudomonas glycinea* , como antígeno, inoculado em um coelho macho da raça Nova Zelândia com aproximadamente 2 kg.

O antígeno constou de uma suspensão de bactérias preparadas conforme o ítem anterior. Após a lavagem as bactérias foram transferidas para uma solução de salina 0,85%. Em 1,0 ml da suspensão foi adicionado adjuvante incompleto de Freund (Difco) até a obtenção de uma emulsão. O antígeno emulsionado foi injetado por via intra-muscular, num total de 14 aplicações com intervalos alternados de três e dois dias. Antes da primeira aplicação do antígeno, fez-se uma sangria para para a obtenção do soro normal (SN) para posterior uso como controle nas reações serológicas (NAMEKATA, 1971). A par

tir da décima segunda aplicação, utilizou-se como antígeno a suspensão de bactérias, fervidas durante dois minutos em salina 0,85% , emulsionada com adjuvante, na mesma concentração e quantidade da anterior, até a 14.<sup>a</sup> aplicação.

A partir da sétima aplicação foram realizadas dez sangrias, também com intervalo de três e dois dias. Os soros foram preparados por coagulação do sangue durante uma hora em condição ambiente e armazenamento por uma noite a 5°C em refrigerador ; a fração soro foi separada por centrifugação a 3.000 gravidades por cinco minutos, sendo posteriormente acondicionada em vidros com uma gota de merthiolate. O antissoro assim preparado foi mantido em congelador até o momento do uso. Por conveniência os antissoros foram codificados como AS<sub>1</sub> , AS<sub>2</sub> , AS<sub>3</sub> , ... , AS<sub>10</sub> .

#### 4.9.3 - REAÇÃO SEROLÓGICA DOS ISOLADOS

Os antígenos usados nas comparações serológicas foram aqueles macerados e fervidos dos isolados de *Pseudomonas glycinea* e saprófitas fluorescentes. Devido às respostas mais nítidas em testes prévios, utilizou-se os antissoros AS<sub>4</sub> e AS<sub>10</sub> contra os antígenos macerados e fervidos. Para tanto, empregou-se a técnica de dupla difusão em gel de agar de Ouchterlony, segundo OLIVEIRA (1967) e KIMATI (1975).

Sobre lâminas de vidro (75 mm x 25 mm) foram colocados 4,0 ml de meio gel (Agar Difco 1% ;  $K_2HPO_4$  -  $KH_2PO_4$  0,1 M ; 0,01% merthiolate e pH 7,2) ainda fundente e deixado solidificar. Posteriormente, com auxílio de um aparelho Furgar (LEITE e OLIVEIRA, 1975) foram feitos orifícios distribuídos em hexágono. Com micro-pipeta de Pasteur distribuiu-se os antígenos e antissoros nos orifícios. As lâminas assim preparadas foram mantidas em placas de Petri com algodão umedecido em água a temperatura ambiente, até o aparecimento das linhas de precipitação.

Para a avaliação da especificidade dos antissoros comparou-se a reação destes com os antígenos AGr , AGa , AGt e AGx. Todos esses testes foram repetidos quatro vezes , tendo como controle o soro normal e o antígeno homólogo para melhor caracterização dos resultados.

#### 4.9.4 - TITULAÇÃO DO ANTÍGENO E ANTISSORO

A titulação do antígeno homólogo macerado e fervido bem como dos antissoros, foi realizada através da técnica de dupla difusão em agar. Fez-se a diluição, em salina tampoadada, por fatores de  $2^n$  , onde "n" variou de 1 a 6.

Para a titulação dos antígenos, procedeu-se as suas diluições frente aos dez antissoros. Do mesmo modo, titulou-se os dez antissoros frente ao antígeno macerado e ao fervido.

#### 4.9.5 - TESTE PARA RÁPIDA IDENTIFICAÇÃO SEROLÓGICA AO PATÓGENO NOS TECIDOS INFECTADOS DO HOSPEDEIRO

Folhas ou folíolos infectados artificialmente, em número de três, foram macerados em almofariz juntamente com 5 ml de água destilada. Procedeu-se à filtração deste líquido, através de filtro-papel previamente umedecido em água, coletando-o em tubos de ensaio. Posteriormente, o filtrado foi levado ao fogo de bico de Bunsen para fervura durante dois minutos. Em lâminas preparadas conforme o item 4.9.3, transferiu-se esta suspensão com micro-pipeta de Pasteur para os orifícios da lâmina. Seis isolados de *Pseudomonas glycinea* preparados desta maneira foram reagidos com o antissoro - 4, procedendo-se também à titulação da suspensão fervida.

#### 4.10 - RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

##### 4.10.1 - DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE RESISTÊNCIA

Determinou-se os níveis de resistência dos isolados aos antibióticos pelo método de diluição em placas com concentrações crescentes das drogas no meio de cultura, segundo a técnica utilizada por AZEVEDO (1961).

No mesmo dia do uso, verteu-se cerca de 20 ml de meio P C G acrescido das soluções das drogas para se obterem as concentrações finais de 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128,

256 , 512 e 1.024  $\mu\text{g/ml}$  do meio de cultura.

Quando os níveis de resistência estiveram abaixo de 1,0  $\mu\text{g/ml}$  usou-se as concentrações de 0,01 , 0,02 , 0,04 , 0,08 , 0,16 , 0,32 , 0,64 , 1,28 e 2,56  $\mu\text{g/ml}$  do meio de cultura.

A solução estoque do antibiótico foi preparada adicionando-se o produto em 100 ml de água esterilizada, posteriormente transferindo-se alíquotas para o meio de cultura a 45°C para se obterem as concentrações desejadas do antibiótico.

O excesso de umidade das placas foi removido por evaporação em câmara asséptica, mantendo-se as tampas ligeiramente abertas.

Cada um dos isolados foi incubado em meio P C G líquido por 72 horas a 26°C sendo após transferidos com auxílio de multi-alça (13 unidades) para as placas com meio de cultura + antibiótico. Como controle, usou-se placas sem a droga. Após 48 - 72 horas de incubação, observou-se os resultados, sendo considerado como nível de resistência aquele cujo crescimento da bactéria ocorria na máxima concentração não inibitória da droga.

#### 4.10.2 - MUTANTES RESISTENTES À ESTREPTOMICINA EM RELAÇÃO A BACTERIOCINAS E PATOGENICIDADE

Subculturas de dois isolados produtores de bacteriocina que apresentaram crescimento na maior concentração não inibitória da estreptomicina foram suspensos em água estéril e 0,1 ml desta suspensão inoculada, com alça de Drigalski, em placas de Petri contendo meio PCG + antibióticos na concentração de 50 µg/ml do meio e incubados por 72 horas a 26°C. Colônias desenvolvidas neste meio foram transferidas para placas contendo as concentrações de 1 , 10 , 20 , 50 , 100 , 250 , 500 e 1.000 µg/ml de estreptomicina no meio de cultura. Os mutantes desenvolvidos na maior concentração foram testados para a produção de bacteriocina conforme o ítem 4.8 e patogenicidade (ítem 4.4.2) , comparando-os com os isolados originais.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 - ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO DO PATÓGENO E CARACTERIZAÇÃO DOS SAPRÓFITAS

Todos os isolados patogênicos formaram pigmento fluorescente no meio de King e foram dihidrolase e oxidase negativos, sendo que os três isolados saprófitas, também fluorescentes, foram separados com base nos postulados de Koch. As folhas e folíolos do cultivar Santana foram infectados somente pelos 13 isolados patogênicos.

## 5.2 - DETECÇÃO DA PATOGENICIDADE ATRAVÉS DA HIPERSENSIBILIDADE EM FOLHAS DE FUMO

Quando os isolados patogênicos e saprófitas, com a mesma concentração de células ( $10^8$  cel/ml), foram inoculados em folhas de fumo foi possível separá-los em dois grupos. Os isolados tidos como patogênicos foram aptos a induzir reação de hipersensibilidade ; esta condição no entanto não foi verificada para o grupo dos saprófitas. Os testes de patogenicidade na soja confirmaram os resultados, mostrando que somente os capazes de induzir a reação de hipersensibilidade foram também patogênicos. Os resultados estão sumarizados na Tabela 2 .

## 5.3 - RELAÇÃO ENTRE PATOGENICIDADE E MORFOLOGIA DE COLÔNIAS DE *Pseudomonas glycinea* EM MEIO DE TETRAZOLIUM

Quando subculturas dos isolados B<sub>13</sub> e B<sub>69</sub>, mantidas em estoque, foram observadas em meio tetrazolium notou-se diferenças na coloração exibida pelas colônias em ambos os isolados. Foi possível observar dois tipos de colônias: um tipo inteiramente vermelho, circular, com bordo branco estreito e com diâmetro variável de 1,5 mm a 2,5 mm (Tipo I) e um segundo tipo, também circular, em alguns casos ligeiramente irregular, apresentando um centro de rosa a vermelho e bordo mais largo descolorido, tendo um diâmetro de 1,0 mm a 2,0 mm, (Tipo II) (Figura 1).

TABELA 2 - Reação de hipersensibilidade em folha de fumo (cultivar Virginia Coker 254) e sua correlação com patogenicidade em soja (cultivar Santana), de 13 isolados de *Pseudomonas glycinea* e três bactérias saprófitas fluorescentes

Isola- dos	(1) Hipersensibilidade em fumo nas horas indicadas após a inoculação			(2) Patogenici- dade em soja sete dias após a ino- culação
	12	24	48	
S	+	++	++	P
BO <sub>1</sub>	+	++	++	P
BO <sub>4</sub>	+	++	++	P
BO <sub>7</sub>	+	++	++	P
B <sub>13</sub>	+	++	++	P
B <sub>69</sub>	+	++	++	P
B <sub>71</sub>	+	++	++	P
Pg <sub>1</sub>	+	++	++	P
Pg <sub>2</sub>	+	++	++	P
Pg <sub>3</sub>	+	++	++	P
Pg <sub>4</sub>	+	++	++	P
Pg <sub>5</sub>	+	++	++	P
Pg <sub>6</sub>	+	++	++	P
S <sub>1</sub> (*)	-	-	-	NP
S <sub>2</sub> (*)	-	-	-	NP
S <sub>3</sub> (*)	-	-	-	NP

(1) (-) Ausência de reação,  
(+) Perda da turgescência,  
(++) Necrose,

(2) (P) Patogênico,  
(NP) Não patogênico,  
(\*) Saprófitas.

Com a finalidade de confirmar os resultados acima, foram obtidos isolados provenientes de lesões novas infectadas artificialmente. Quando estes isolados foram cultivados em meio de tetrazolium, houve o aparecimento de colônias, na quase totalidade, do segundo tipo (Figura 1).

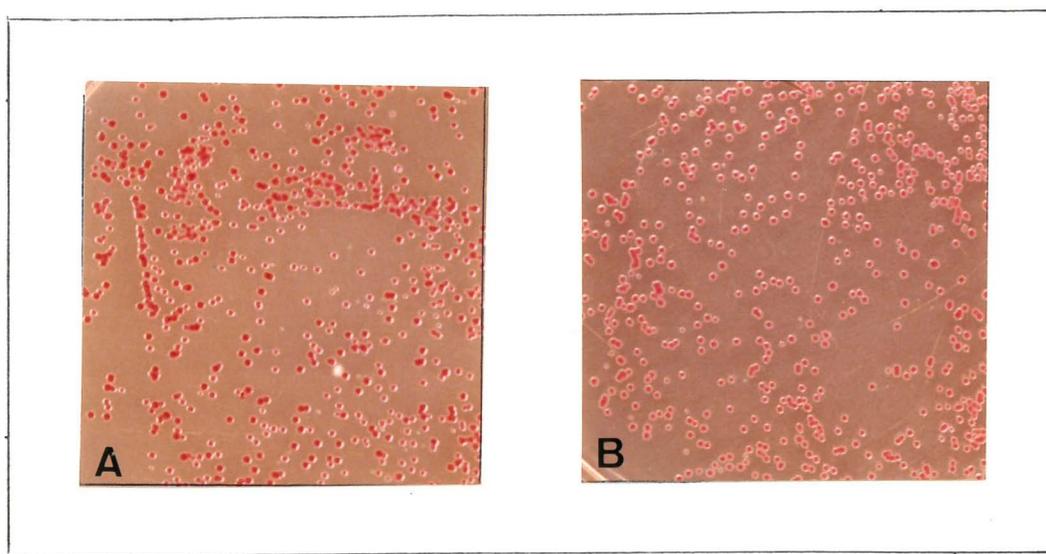


FIGURA 1 - Colônias de *Pseudomonas glycinea* em meio de tetrazolium:

- A - Provenientes de cultura estoque, com cinco meses de idade, com predominância de colônias tipo I.
- B - Provenientes de cultura recém isolada, com predominância de colônias tipo II.

Nos testes de patogenicidade foi possível observar que as colônias com centro rosa infectaram os tecidos inoculados mais rapidamente do que as colônias totalmente vermelhas, como é evidenciado nas Tabelas 3 e 4 .

TABELA 3 - Relação entre a patogenicidade em soja (cultivar Santana) e morfologia da colônia de *Pseudomonas glycinea*, isolado B<sub>13</sub> , em meio de tetrazolium em função das médias do diâmetro, em centímetros da área afetada

Tipo de Colônia	Diâmetro da lesão (em cm) nos dias após a inoculação (1)		
	12 dias	20 dias	30 dias
I	1,1200 a	1,2150 a	1,3350 a (*)
II	1,4150 b	1,4625 b	1,5375 b

(\*) Médias não seguidas pela mesma letra diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%

(DMS Tukey 5% = 0,0850)

Tipo I = colônia inteiramente vermelha, circular, com bordo branco estreito e diâmetro de 1,5 mm a 2,0 mm.

Tipo II = colônia com centro rosa a vermelho, circular, com bordo branco largo e diâmetro de 1,0 mm a 2,0 mm.

(1) Média de quatro repetições, cada uma representada por um vaso contendo três plantas.

TABELA 4 - Relação entre a patogenicidade em soja (cultivar Santana) e morfologia da colônia de *Pseudomonas glucinea*, isolado B<sub>69</sub>, em meio de tetrazolium em função das médias do diâmetro, em centímetros, da área afetada

Tipo de Colônia	Diâmetro da lesão (em cm) nos dias após a inoculação (1)		
	12 dias	20 dias	30 dias
I	0,9200 a	0,9900 a	1,1250 a <sup>(*)</sup>
II	1,3050 b	1,3800 b	1,5375 b

(\*) Médias não seguidas pela mesma letra diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% (DMS Tukey 5% 2 0,0935)

Tipo I = colônia vermelha, circular, com bordo branco estreito e diâmetro de 1,5 mm a 2,5 mm.

Tipo II = colônia com centro rosa a vermelho, circular, com bordo branco largo e diâmetro de 1,0 mm a 2,0 mm.

(1) Média de oito repetições, cada uma representada por um vaso contendo três plantas.

#### 5.4 - RELAÇÃO ENTRE O TIPO DE COLÔNIA EM MEIO DE TETRAZOLIUM E HIPERSENSIBILIDADE EM FOLHAS DE FUMO

Quando se realizaram as inoculações, o tempo necessário para o aparecimento da reação de hipersensibilidade foi variável. No entanto, todas as colônias vermelhas ou de centro rosa a vermelho foram aptas a induzir necrose nos tecidos dentro de 48 horas após a inoculação. A relação entre

a hipersensibilidade e o tipo de colônia em tetrazolium está sumarizado na Tabela 5.

## 5.5 - PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS

Quando se realizaram os testes cruzados para verificação de produção de bacteriocinas, utilizando-se os 13 isolados de *Pseudomonas glycinea*, foi possível obter 38% de isolados bacteriocinogênicos. A relação dos isolados produtores e sensíveis encontra-se na Tabela 6.

Observa-se que, entre os isolados produtores,  $BO_1$  e  $BO_4$  produziram bacteriocinas contra o maior número de isolados. O isolado  $BO_1$ , no entanto, mostrou-se também como um dos mais sensíveis. Diferente dos demais, o isolado  $B_{71}$  produziu uma bacteriocina ativa contra somente um dos isolados. Além disso, entre os isolados indicadores, cinco foram sensíveis às bacteriocinas e, entre estes, apenas o isolado  $Pg_3$  não produziu nenhuma bacteriocina.

Quando os isolados foram previamente induzidos com luz ultra-violeta houve uniformidade quanto à dimensão do halo de inibição, ao contrário do que aconteceu anteriormente quando, sem este tratamento, o isolado  $B_{13}$  mostrou um halo de inibição ligeiramente menor que os demais isolados produtores de bacteriocinas.

TABELA 5 - Relação entre a hipersensibilidade em fumo (cultivar Virginia Coker 254) e a morfologia da colônia, em meio de tetrazolium, de seis isolados de *Pseudomonas glycinea*

Isolados	Tipos de colônia	Reação do fumo nas horas após a inoculação				
		12	24	36	48	72
B0 <sub>4</sub>	I	-	-	+	++	++
	I	-	-	+	++	++
	II	-	-	+	++	++
B <sub>69</sub>	I	-	-	+	++	++
	II	+	++	++	++	++
	II	+	+	++	++	++
Pg <sub>5</sub>	II	++	++	++	++	++
	II	+	++	++	++	++
	II	-	+	++	++	++
Pg <sub>6</sub>	I	+	++	++	++	++
	II	-	-	+	++	++
	II	++	++	++	++	++
Pg <sub>2</sub>	I	-	-	+	++	++
	II	-	+	++	++	++
	II	+	++	++	++	++
Pg <sub>3</sub>	I	-	+	++	++	++
	I	-	-	+	++	++
	II	+	++	++	++	++
B <sub>13</sub>	I	-	-	+	++	++
	I	-	-	+	++	++
	II	-	+	++	++	++

(-) Amarecimento do tecido

(+) Perda de turgência do tecido

(++) Necrose do tecido

Tipo I - Colônia inteiramente vermelha, circular, com bordo branco estreito e diâmetro de 1,5 mm a 2,5 mm.

Tipo II - Colônia com centro rosa a vermelho, circular, com bordo branco largo e diâmetro de 1,0 mm a 2,0 mm.



## 5.6 - SEROLOGIA

### 5.6.1 - REAÇÃO SEROLÓGICA DOS ISOLADOS

Os resultados das reações dos testes de dupla difusão em agar (Ouchterlony) entre os 13 isolados de *Pseudomonas glycinea* e co-habitantes saprófitas fluorescentes, para os antissoros AS<sub>4</sub> e AS<sub>10</sub>, obtidos com o isolado BO<sub>4</sub>, são apresentados na Tabela 7.. O processo de aquecimento a 100°C por dois minutos dos isolados de *Pseudomonas glycinea* permitiu reações serológicas mais intensas, manifestadas pelo aparecimento de duas linhas de precipitação para ambos os antissoros. Com maceração mecânica dos isolados houve diferenças no número de linhas de precipitação em relação ao antissoro AS<sub>4</sub>, mas não para o antissoro AS<sub>10</sub>.

Todos os isolados de *Pseudomonas glycinea* reagiram com o antissoro obtido, qualquer que fosse o método de preparação do antígeno. Em contraste, não houve reação com os saprófitas fluorescentes, tanto aquecidos como macerados.

Apesar de que o antissoro foi obtido contra o isolado BO<sub>4</sub>, produtor de bacteriocina, não foi possível distinguir relações serológicas entre os demais isolados produtores ou sensíveis a esta substância.

O antissoro foi ainda comparado com *Pseudomonas rubrilineans*, *Pseudomonas alboprecipitans*, *Pseudomonas tomato* e *Xanthomonas vesicatoria* não havendo, entretanto, rea-

ções serológicas.

TABELA 7 - Comportamento serológico dos isolados de *Pseudomonas glycinea*, submetidos ao aquecimento a 100°C e a maceração, frente aos antissoros AS<sub>4</sub> e AS<sub>10</sub>, pelo método de dupla difusão em gel de agar

Isolados	Antígenos aquecidos		Antígenos macerados	
	AS <sub>4</sub>	AS <sub>10</sub>	AS <sub>4</sub>	AS <sub>10</sub>
S	++	++	+	++
B0 <sub>1</sub>	++	++	+	++
B0 <sub>4</sub>	++	++	+	++
B0 <sub>7</sub>	++	++	+	++
B <sub>13</sub>	++	++	+	++
B <sub>69</sub>	++	++	+	++
B <sub>71</sub>	++	++	+	++
Pg <sub>1</sub>	++	++	+	++
Pg <sub>2</sub>	++	++	+	++
Pg <sub>3</sub>	++	++	+	++
Pg <sub>4</sub>	++	++	+	++
Pg <sub>5</sub>	++	++	+	++
Pg <sub>6</sub>	++	++	+	++
S <sub>1</sub> (*)	o	o	o	o
S <sub>2</sub> (*)	o	o	o	o
S <sub>3</sub> (*)	o	o	o	o

(\*) Saprófita

(o) Ausência de linha de precipitação

(+) Presença de uma linha de precipitação

(++) Presença de duas linhas de precipitação

## 5.6.2 - TITULAÇÃO DO ANTÍGENO E ANTÍSSORO

Nos testes de titulação do antígeno submetido ao aquecimento verificou-se a formação de linhas de precipitação até à diluição de 1 : 4 do primeiro ao sexto antíssoro. O título aumentou para 1 : 8 em relação ao AS<sub>7</sub> , AS<sub>8</sub> e AS<sub>9</sub> e para 1 : 32 em relação ao antíssoro 10.

Para o antígeno submetido à maceração houve linha de precipitação à diluição de 1 : 4 do primeiro ao oitavo antíssoro, aumentando o título para 1 : 8 em relação ao AS<sub>9</sub> e para 1 : 32 ao AS<sub>10</sub> .

O número de linhas de precipitação ocorridas à cada diluição do antígeno aquecido ou macerado, em relação aos antíssoros, está sumarizado nas Tabelas 8 e 9 , respectivamente.

A titulação de cada uma dos antíssoros, reagindo com o antígeno homólogo aquecido ou macerado, indicaram o mesmo nível de diluição. Independente do tipo do antígeno, o título foi de 1 : 4 do primeiro ao sexto antíssoro. Houve um aumento do título para 1 : 8 com os antíssoros AS<sub>7</sub> e AS<sub>8</sub> e de 1 : 32 com os antíssoros AS<sub>9</sub> e AS<sub>10</sub> .

Os níveis da titulação dos antíssoros, bem como o número de linhas de precipitação, estão sumarizados nas Tabelas 10 e 11 em relação ao antígeno homólogo aquecido e macerado, respectivamente.

TABELA 8 - Titulação do antígeno (isolado B0<sub>4</sub>), submetido ao aquecimento a 100°C, pelo método de dupla difusão em gel de agar em relação aos antissoros

Diluição do antígeno	Antissoros									
	AS <sub>1</sub>	AS <sub>2</sub>	AS <sub>3</sub>	AS <sub>4</sub>	AS <sub>5</sub>	AS <sub>6</sub>	AS <sub>7</sub>	AS <sub>8</sub>	AS <sub>9</sub>	AS <sub>10</sub>
1/1	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
1/2	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
1/4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1/8	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
1/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1/32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

- (0) Ausência de linha de precipitação  
 (-) Linha de precipitação fraca  
 (+) Linha de precipitação forte

TABELA 9 - Titulação do antígeno (isolado B0<sub>4</sub>), submetido à maceração, pelo método de dupla difusão em gel de agar, em relação aos antissoros

Diluição do antígeno	Antissoros									
	AS <sub>1</sub>	AS <sub>2</sub>	AS <sub>3</sub>	AS <sub>4</sub>	AS <sub>5</sub>	AS <sub>6</sub>	AS <sub>7</sub>	AS <sub>8</sub>	AS <sub>9</sub>	AS <sub>10</sub>
1/1	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
1/2	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
1/4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
1/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
1/32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-

- (0) Ausência de linha de precipitação  
 (-) Linha de precipitação fraca  
 (+) Linha de precipitação forte

TABELA 10 - Titulação dos antissoros, em relação ao antígeno homólogo (isolado B<sub>04</sub>) aquecido a 100°C, pelo método de dupla difusão em gel de agar

Diluição dos antissoros	Antissoros									
	AS <sub>1</sub>	AS <sub>2</sub>	AS <sub>3</sub>	AS <sub>4</sub>	AS <sub>5</sub>	AS <sub>6</sub>	AS <sub>7</sub>	AS <sub>8</sub>	AS <sub>9</sub>	AS <sub>10</sub>
1/1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
1/2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
1/4	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
1/8	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
1/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1/32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

- (o) Ausência de linha de precipitação  
 (-) Linha de precipitação fraca  
 (+) Linha de precipitação forte

TABELA 11 - Titulação dos antissoros, em relação ao antígeno homólogo (isolado BO<sub>4</sub>) submetido à maceração, pelo método de dupla difusão em gel de agar

Diluição dos antissoros	Antissoros										
	AS <sub>1</sub>	AS <sub>2</sub>	AS <sub>3</sub>	AS <sub>4</sub>	AS <sub>5</sub>	AS <sub>6</sub>	AS <sub>7</sub>	AS <sub>8</sub>	AS <sub>9</sub>	AS <sub>10</sub>	
1/1	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
1/2	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
1/4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1/8	o	o	o	o	o	o	-	-	-	-	-
1/16	o	o	o	o	o	o	o	o	o	-	-
1/32	o	o	o	o	o	o	o	o	o	-	-

(o) Ausência de linha de precipitação  
 (-) Linha de precipitação fraca  
 (+) Linha de precipitação forte

### 5.6.3 - TESTE PARA RÁPIDA IDENTIFICAÇÃO SEROLÓGICA DO PATÓGENO NOS TECIDOS INFECTADOS DO HOSPEDEIRO

Os isolados B0<sub>1</sub> , B0<sub>4</sub> , B<sub>69</sub> , Pg<sub>2</sub> , Pg<sub>5</sub> e Pg<sub>6</sub> de *Pseudomonas glycinea* foram inoculados artificialmente na soja e as folhas ou folíolos infectados utilizados no teste.

Em teste de dupla difusão em gel de agar, o antissoro AS<sub>4</sub> reagiu com o líquido resultante da maceração das folhas apresentando, contra todos os isolados utilizados, uma linha de precipitação. Com o controle, folhas de soja não infectadas maceradas, não houve reação com o antissoro utilizado. O título do líquido resultante da maceração das folhas infectadas também foi determinado contra o antissoro AS<sub>4</sub> , obtendo-se reações nítidas de uma linha de precipitação até a diluição 1:4. Cada teste foi repetido, pelo menos, três vezes.

## 5.7 - RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

### 5.7.1 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÁXIMA NÃO INIBITÓRIA

Os resultados do teste de determinação da concentração máxima não inibitória dos isolados em relação aos quatro antibióticos utilizados encontram-se na Tabela 12.

TABELA 12 - Níveis de resistência dos 13 isolados de *Pseudomonas glycinea* expressos em  $\mu\text{g}$  do antibiótico por ml de meio de cultura

Isolados	Máxima concentração não inibitória (1) (seg/ml) dos isolados aos antibióticos (2)			
	Ks	Str	Tm	Tc
S	4,0	0,32	0,04	0,16
B0 <sub>1</sub>	8,0	0,32	0,04	0,32
B0 <sub>4</sub>	8,0	0,32	0,04	0,16
B0 <sub>7</sub>	8,0	0,32	0,04	0,16
B <sub>13</sub>	4,0	0,32	0,04	0,32
B <sub>69</sub>	8,0	0,16	0,02	0,08
B <sub>71</sub>	8,0	0,16	0,04	0,16
Pg <sub>1</sub>	4,0	0,16	0,04	0,32
Pg <sub>2</sub>	8,0	0,32	0,04	0,16
Pg <sub>3</sub>	8,0	0,16	0,02	0,08
Pg <sub>4</sub>	8,0	0,32	0,04	0,16
Pg <sub>5</sub>	8,0	0,16	0,04	0,32
Pg <sub>6</sub>	4,0	0,32	0,04	0,32

(1) Média de três placas

(2) Ks = Kasugamicina,  
 Str = Estreptomicina,  
 Tm = Terramicina  
 Tc = Tetraciclina

Em relação à kasugamicina, foi encontrado 69,2% de isolados resistentes ao nível de 8,0 µg/ml do antibiótico. Para a estreptomicina, 61,5% dos isolados mostraram resistência à concentração de 0,32 µg/ml do antibiótico. Os resultados com terramicina mostraram uma maior uniformidade na resistência entre os isolados, atingindo quase a totalidade destes (84,6%) ao nível de 0,04 µg/ml. Com a tetraciclina, o comportamento da resistência dos isolados foi mais variável; somente 38,4% atingiu o máximo de resistência à concentração de 0,32 µg/ml do antibiótico.

Os isolados produtores de bacteriocina, B0<sub>1</sub>, B0<sub>3</sub>, B<sub>13</sub>, B<sub>71</sub> e Pg<sub>2</sub> mostraram um comportamento variável às drogas utilizadas quanto a sensibilidade, bem como o isolado indicador Pg<sub>3</sub> mostrando não haver relação entre a produção ou sensibilidade às bacteriocinas com o nível de resistência aos antibióticos.

### 5.7.2 - ISOLAMENTO DE MUTANTES RESISTENTES À ESTREPTOMICINA EM RELAÇÃO A BACTERIOCINAS E PATOGENICIDADE

Dos isolados B0<sub>4</sub> e B<sub>13</sub>, produtores de Bacteriocinas, que apresentaram níveis de resistência mais altos à estreptomicina (0,32 µg/ml), foram selecionadas três colônias de cada isolado e que cresceram em meio de cultura com 50 µg/ml

de estreptomicina. A comparação do crescimento em diferentes concentrações da droga entre os isolados originais e seus respectivos mutantes é sumarizada na Tabela 13.

No teste de produção de bacteriocina, o isolado original, bem como os mutantes não tiveram sua capacidade bacteriocinogênica afetada (Tabela 14). Com relação à patogenicidade (Tabela 14), dois mutantes do isolado original B<sub>04</sub> e o mutante do isolado original B<sub>13</sub> testado mostraram-se apatógenicos quando inoculados na soja.

TABELA 13 - Crescimento dos isolados originais B<sub>04</sub> e B<sub>13</sub> em comparação com os mutantes resistentes à estreptomicina em diferentes concentrações da droga

Isolados	Presença (+) ou ausência (o) de crescimento da bactéria (1) na concentração da droga (µg / ml)							
	1	10	25	50	100	250	500	1000
B <sub>04</sub>	o	o	o	o	o	o	o	o
B <sub>04</sub> str <sub>1</sub>	+	+	+	+	+	+	o	o
B <sub>04</sub> str <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+	o	o
B <sub>04</sub> str <sub>3</sub>	+	+	+	+	+	+	+	o
B <sub>13</sub>	o	o	o	o	o	o	o	o
B <sub>13</sub> str <sub>1</sub>	+	+	+	+	+	+	+	o
B <sub>13</sub> str <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+	o	o
B <sub>13</sub> str <sub>3</sub>	+	+	+	+	+	+	o	o

(1) Observação em três placas.

TABELA 14 - Comparação da capacidade patogênica e produção de bacteriocina das linhagens originais e seus mutantes resistentes à estreptomicina

Isolados	Patogenicidade	Bacteriocina
B <sub>04</sub> original	patogênico	produtor
B <sub>04</sub> str <sub>1</sub>	não patogênico	produtor
B <sub>04</sub> str <sub>2</sub>	patogênico	produtor
B <sub>04</sub> str <sub>3</sub>	não patogênico	produtor
B <sub>13</sub> original	patogênico	produtor
B <sub>13</sub> str <sub>1</sub>	não patogênico	produtor
B <sub>13</sub> str <sub>2</sub>	(*)	produtor
B <sub>13</sub> str <sub>3</sub>	(*)	produtor

(\*) = Não testados

## 6 - DISCUSSÃO

### 6.1 - DETECÇÃO DA PATOGENICIDADE ATRAVÉS DA HIPERSENSIBILIDADE EM FOLHAS DE FUMO

Alguns autores têm sugerido (STARR, 1959 ; STOLP, 1961) que não é possível separar as bactérias fitopatogênicas das saprófitas exceto pela patogenicidade. Os resultados obtidos aqui, com hipersensibilidade em fumo, justificam a validade do método para esta finalidade. Estudos prévios realizados por LEBEN *et alii* (1968) e LEBEN (1972) têm demonstrado a dificuldade de se separar *Pseudomonas glycinea* de co-habitantes não-patogênicos. Pelo cultivo das bactérias em meio de King B este problema pode ser, em parte, eliminado testando-se somente aquelas colônias que apresentam fluorescência. Os resultados exibidos na Tabela 2 evidenciam que os isolados patogênicos à soja causaram um rápido colapso na organização

celular de tecidos inoculados em plantas de fumo. Tal resposta é característica da reação de hipersensibilidade (KLEMENT, 1963 ; KLEMENT *et alii*, 1964). A ocorrência, em soja, de *Pseudomonas* fluorescentes que não induziram reação de hipersensibilidade em fumo e também não foram patogênicos à soja, poderia indicar tratarem-se de isolados de *Pseudomonas glycinea* que tivessem sua capacidade patogênica alterada, conforme observação feita por LELLIOT *et alii* (1966) em *Pseudomonas coronofaciens*. Tal, no entanto, não deve ser verdade uma vez que esses isolados não reagiram ao antissoro de *Pseudomonas glycinea* (Tabela 6).

A indução da hipersensibilidade pelos isolados de *Pseudomonas glycinea* neste estudo estão em concordância com aqueles obtidos por SANDS *et alii* (1970) e em discordância com aquele obtido por MISAGHI e GROGAN (1969). Estes últimos autores relataram apenas dois isolados de *Pseudomonas glycinea*, de quatro utilizados, aptos a induzirem a reação de hipersensibilidade em folha de fumo. Coincidentemente, dois dos quatro isolados testados tinham a capacidade de reduzir nitratos, característica não encontrada em *Pseudomonas glycinea* (COERPER, 1919 ; SANDS *et alii*, 1970) o que faz supor não serem aqueles isolados pertencentes a esta espécie.

## 6.2 - RELAÇÃO ENTRE A PATOGENICIDADE E MORFOLOGIA DE COLÔNIAS DE *Pseudomonas glycinea* EM MEIO DE TETRAZOLIUM

Em várias publicações sobre os uso do cloreto de trifênil tetrazolium, em meio de cultura para bactérias fitopatogênicas, confirma-se a viabilidade deste método na distinção de mutantes não-patogênicos (KELMAN, 1954 ; FRIEDMAN, 1964 ; CARROL e LUKEZIC, 1971). Os isolados frequentemente têm sua capacidade patogênica alterada quando armazenados pelos métodos rotineiros (TUIITE, 1969). Como foi observado por KELMAN (1954), mesmo o armazenamento em óleo mineral não previne o desenvolvimento de mutantes com reduzida patogênicade e os resultados aqui obtidos indicam que um período de cinco meses já é suficiente para que alterações ocorram na patogenicidade dos isolados.

Nos resultados obtidos com *Pseudomonas glyci* - *nea* , como mostram as Tabelas 3 e 4 , existem evidências de que colônias totalmente vermelhas com bordo branco estreito são fracamente patogênicas, enquanto que colônias com centro de coloração rosa a ligeiramente vermelho com bordo branco largo mostram um comportamento mais patogênico. O aparecimento de colônias com esta coloração, em maior número, quando os isolados são provenientes de lesões recentes, em comparação com um maior número de colônias totalmente vermelhas, quando os isolados são provenientes de culturas em estoque, confirma as observações a respeito da perda da patogenicidade que ocorre

com as bactérias quando mantidas fora do hospedeiro (KELMAN e JENSEN, 1951).

Algumas observações têm sido feitas (KOPPER, 1952) no sentido de que existe uma relação entre o maior número de células na colônia bacteriana com o incremento da redução do tetrazolium e, portanto, uma coloração mais vermelha. Provavelmente, a menor capacidade de crescimento em meio artificial das colônias provenientes de lesões recentes esteja relacionado com este fato, da mesma maneira que o variante mais adaptado ao meio de cultura cresceria mais rapidamente desenvolvendo, também, a coloração mais vermelha em meio de tetrazolium.

### 6.3 - RELAÇÃO ENTRE O TIPO DE COLÔNIA EM MEIO DE TETRAZOLIUM E HIPERSENSIBILIDADE EM FOLHAS DE FUMO

O comportamento de colônias do tipo I e II crescidas em meio de tetrazolium, quando inoculadas em folhas de fumo, permite observar (Tabela 5) que colônias do tipo II, referidas como mais patogênicas, têm uma maior tendência a induzir a reação de hipersensibilidade, após doze horas de inoculação, do que colônias do tipo I. No entanto, ambos os tipos de colônias são aptos a induzirem reação de hipersensibilidade após 48 horas indicando que o fumo é menos sensível que o meio de tetrazolium para indicar diferentes graus de patoge

nicidade da bactéria.

Contudo, através da reação de hipersensibilidade, é possível detectar a perda total da patogenicidade (MISAGHI e GROGAN, 1969) ou diferenciar saprófitas das bactérias patogênicas (Tabela 2) (KLEMENT, 1963). Tais resultados indicam que a perda parcial da patogenicidade não pode ser detectada pelo fumo, visto que ainda são capazes de induzir os tecidos inoculados à necrose.

#### 6,4 - PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS

O espectro das bacteriocinas produzidas pelos cinco isolados de *Pseudomonas glycinea*, neste estudo, foram limitados a outros isolados desta mesma espécie e não tiveram efeito inibitório sobre *Pseudomonas alboprecipitans* e *Pseudomonas rubrilineans*. Entretanto, VIDAVER *et alii* (1972) observaram a atividade de bacteriocinas desta bactéria contra outras não relacionadas. A atividade das bacteriocinas é, geralmente, contra outros isolados da mesma espécie ou então entre espécies que sejam muito relacionadas (REEVES, 1965). No entanto, em alguns casos, bacteriocinas de bactérias gram-negativas podem inibir bactérias gram-positivas (HAMON e PERON, 1961) como também as gram-positivas inibiram as espécies gram-negativa (TAGG *et alii*, 1976).

Comparando com outras bacteriocinas já investi gadas, a porcentagem de isolados produtores (38%) é relativa mente próxima daquela observada por VIDAVER *et alii* (1972) que obtiveram 55% também com isolados de *Pseudomonas glycinea*. O número de isolados produtores é bastante variável entre espécies (AZEVEDO, 1977). Assim, é possível encontrar níveis tão baixos quanto 8% , em *Pseudomonas phaseolicola* , até 100% em *Pseudomonas syringae* (VIDAVER *et alii*, 1972), passando por 57% em *Corynebacterium michiganense* (ECHANDI, 1976) , 88% em *Erwinia carotovora* (ECHANDI e MOYER, 1979) e 47% em *Xanthomonas campestris* (SANTOS, 1979). Estes comportamentos sugerem que a produção de bacteriocinas pode ter importante função na epidemiologia de doenças causadas por bactérias.

Dentre os isolados testados o B<sub>13</sub> apresentou um diâmetro do halo de inibição igual aos demais somente quando previamente submetido à luz ultra-violeta. Isto sugere que a bacteriocina produzida por esse isolado não é totalmente liberada pelo tratamento com clorofórmio. A síntese de muitas bacteriocinas é induzida pela irradiação ultra-violeta (REEVES, 1965). Contudo, já tem sido observado que a atividade da bacteriocina produzida por *Pseudomonas glycinea* pode aumentar ou diminuir após a irradiação (VIDAVER *et alii*, 1972).

Dentre os isolados produtores, dois deles, BQ<sub>1</sub> e BQ<sub>4</sub> , produziram bacteriocina contra os mesmos isolados indicadores. No entanto, se BQ<sub>1</sub> produzisse um tipo de bacterio

cina semelhante à produzida pelo isolado B0<sub>4</sub>, estes teriam que ser resistentes às bacteriocinas opostas; como são ambos sensíveis, isto sugere que as bacteriocinas são diferentes e que os isolados podem ser considerados linhagens diferentes.

Observa-se que os isolados produtores Pg<sub>2</sub>, B<sub>13</sub> e B<sub>71</sub> apresentaram um comportamento diferente quanto a sensibilidade às bacteriocinas e devem portanto ser também linhagens diferentes. Esta observação também é válida para o isolado Pg<sub>3</sub> que não produziu bacteriocina, pelo menos que pudesse ser detectada com os isolados utilizados e foi sensível a diferentes bacteriocinas.

Esta variação na sensibilidade às bacteriocinas produzidas têm sua importância refletida na epidemiologia quando se estuda, por exemplo, o comportamento de raças ou isolados sobre o hospedeiro. De fato, segundo REEVES (1965), a propriedade bacteriocinogênica confere uma considerável vantagem seletiva para a bactéria que a possui, embora estudos ecológicos neste sentido ainda não tenham sido feitos. Conforme JACOB *et alii* (1952) uma partícula de colicina é suficiente para a morte de uma célula sensível; se esta proporção for válida para bactérias fitopatogênicas, maiores cuidados devem ser tomados quando da mistura de raças ou isolados da bactéria, para fins epidemiológicos, uma vez que as que possuírem propriedades bacteriocinogênicas causarão a morte de células sensíveis alterando os resultados das inoculações sobre o hospedeiro.

Para todos os isolados produtores citados aqui, a produção de bacteriocinas foi melhor a 20° - 24°C do que a 28°C, concordando com os resultados de VIDAVER *et alii* (1972) de que a produção ocorre melhor em temperaturas abaixo do ótimo para o crescimento da bactéria.

## 6.5 - REAÇÃO SEROLÓGICA DOS ISOLADOS

O principal objetivo desta investigação foi de determinar se o antissoro poderia ser usado rotineiramente na identificação dos isolados de *Pseudomonas glycinea*.

Com o advento da técnica de dupla difusão em gel de agar os testes serológicos foram amplamente utilizados na identificação de bactérias, uma vez que são mais específicos que outros procedimentos. A literatura a respeito tem justificado a viabilidade do método para este propósito (SHAAD, 1979).

Com efeito, os resultados serológicos apresentados na Tabela 7 indicam que o teste de dupla difusão em agar pode ser usado na rápida identificação de *Pseudomonas glyci*-*nea* uma vez que todos os isolados reagiram com o antissoro obtido. A especificidade do antissoro permitiu distingui-los dos isolados saprófitos fluorescentes, que ocorrem conjuntamente nas lesões causadas pelo patógeno, como também de outras espécies relacionadas ao gênero ou não. Estes dados estão de

acordo com SHATTOCK (1955) que considera a serologia como uma delicada ferramenta com alta especificidade determinada pela natureza química do antígeno.

Houve o mesmo tipo de reação serológica entre os isolados de *Pseudomonas glycinea* para os antissoros AS<sub>4</sub> e AS<sub>10</sub>, exceto quando os antígenos foram macerados mecanicamente. A diferença na intensidade da reação pode dever-se ao fato de que os antígenos submetidos ao aquecimento liberam mais componentes antigênicos das células. Em contraste, o processo mecânico de rompimento das células não é suficiente para esta total liberação. Rotineiramente, o processo de maceração dos antígenos resultou em reações com uma linha de precipitação com o antissoro AS<sub>4</sub> e o fato de que houve, por este processo, duas linhas de precipitação em reação com o antissoro AS<sub>10</sub> está provavelmente relacionada com a utilização de antígenos fervidos a partir da décima segunda injeção durante a imunização do coelho. O antissoro AS<sub>7</sub> e seguintes, foram coletados após esta imunização.

## 6.6 - TITULAÇÃO DO ANTÍGENO E ANTISSOROS

### 6.6.1 - TITULAÇÃO DO ANTÍGENO

A análise das Tabelas 8 e 9 mostrou que a titulação do antígeno pode ser modificada pelo tipo de tratamento

a que este é submetido. Embora tenha ocorrido o mesmo título para os antígenos aquecidos ou macerados até o sexto antissoro ( $AS_6$ ), as reações foram mais intensas e com maior número de linhas de precipitação para o primeiro tipo de antígeno. Como já foi citado neste trabalho, isto, provavelmente, se deve à maior liberação dos componentes antigênicos pelo aquecimento. Como foi possível observar, este processo é mais sensível nas reações serológicas, uma vez que a imunização com antígeno aquecido a partir da coleta do antissoro  $AS_6$  já detectava um aumento no título e intensidade de reação contra o antissoro seguinte  $AS_7$ ; com o antígeno macerado, o aumento do título só foi verificado a partir do antissoro  $AS_9$ .

Tem sido sugerido por DAVIS *et alii* (1973) que as endotoxinas de bactérias gram-negativas, tidas como componentes antigênicos, somente são liberadas se houver rompimento das células. Assim, a imunização com antígeno aquecido aumentaria a formação de anticorpos e conseqüentemente, o título.

### 6.6.2 - TITULAÇÃO DOS ANTISSOROS

A análise das reações obtidas, do antissoro  $AS_1$  ao antissoro  $AS_6$ , mostrou que o título dos antissoros neste intervalo atingem os mesmos níveis de diluição, quando reagido com o antígeno-homólogo (isolado  $B0_4$ ) aquecido ou macerado, po

rêm com reações mais intensas contra o antígeno aquecido. As razões disto já foram anteriormente explicadas.

O baixo título obtido entre o antissoro AS<sub>1</sub> ao AS<sub>6</sub> é devido, provavelmente, ao curto período de imunização pois foram coletados entre um número de seis até onze aplicações do antígeno. A partir do sétimo antissoro ocorre um aumento do título até atingir 1:32 no nono e décimo antissoro. Como o período entre a coleta do AS<sub>6</sub> e AS<sub>7</sub> foi bastante curto, a razão desse aumento é devido à imunização com o antígeno aquecido.

Como os diferentes propósitos da serologia requerem antissoros com diferentes títulos (SHAAD, 1979), é possível obter-se, no caso, título baixo através da imunização com antígeno macerado e posteriormente aumentá-lo através do antígeno aquecido. Para esta situação o título mais alto obtido com o antissoro AS<sub>10</sub> não alterou sua especificidade, como pode ser observado na Tabela 7.

## 6.7 - TESTE PARA RÁPIDA IDENTIFICAÇÃO SEROLÓGICA DO PATÓGENO, NOS TECIDOS INFECTADOS DO HOSPEDEIRO

A especificidade do antissoro obtido permitiu o seu uso na detecção serológica de *Pseudomonas glycinea* diretamente dos tecidos de soja. Embora o antissoro tenha sido testado apenas contra saprófitas fluorescentes, é provável

que o restante da flora bacteriana que ocorre sobre a soja não reage com o antissoro, o que sugere sua viabilidade para uma rápida diagnose da doença.

Algumas técnicas serológicas para a detecção em plantas infectadas têm sido desenvolvidas com sucesso como a de GUTHRIE *et alii* (1965) e MORTON *et alii* (1965). Os primeiros, através da serologia, obtiveram um método rápido e altamente específico para a detecção de sementes infectadas com *Pseudomonas phaseolicola*; os demais autores conseguiram, pelo extravasamento mecânico da seiva e coleta de exudados, detectar efetivamente a presença de *Pseudomonas solanacearum*.

Embora não se tenha avaliado o grau de infecção do material utilizado, o título da suspensão obtida (1:4) sugere que é possível detectar o patógeno ainda que o número de lesões seja pequeno. Um aperfeiçoamento deste método poderia também ser útil, não somente na diagnose rápida da doença mas também para se determinar o nível de infecção do patógeno.

#### 6.8 - RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS: CONCENTRAÇÃO MÁXIMA NÃO INIBITÓRIA E RELAÇÃO ENTRE MUTANTES RESISTENTES COM PRODUÇÃO DE BACTERIOCINA E PATOGENICIDADE

O comportamento dos isolados quanto a sensibilidade aos antibióticos mostrou que a terramicina tem uma ação mais efetiva contra *Pseudomonas glycinea*. Foram encontra

dos níveis de resistência de 4,0 a 8,0 µg/ml para Kasugamicina ; de 0,16 a 0,32 µg/ml para a Estreptomicina e Tetraciclina e de 0,02 a 0,04 µg/ml para a Terramicina. Estes dados , se comparados com bactérias sujeitas a tratamento com antibioticos, são extremamente baixos, indicando não haver resistência natural ao antibiotico.

Mutantes de *Pseudomonas glycinea* resistentes à Estreptomicina foram encontrados após uma única passagem da bactéria em meio de cultura contendo o antibiotico, segundo o modelo denominado por DEMEREC (1948) de "um só passo". Isto equivale a dizer que mutação em um gene é suficiente para determinar resistência a altas concentrações de antibiotico.

O caráter resistência a Estreptomicina exibido pelos seis mutantes isolados neste trabalho não condicionou perda da capacidade de produzir bacteriocinas (Tabela 14) mas, ao contrário, condicionou perda de patogenicidade na maioria dos isolados resistentes já que, dos quatro testados, somente um manteve sua patogenicidade em soja (Tabela 14). Este fato pode ser explicado considerando-se a possível natureza cromosomal da patogenicidade (STARR, 1959) e da resistência a Estreptomicina, em oposição à natureza plasmidial da capacidade de produzir bacteriocina (REEVES, 1965).

O fato da perda da patogenicidade ser comum nos mutantes que adquirem resistência a drogas e da produção de

bacteriocina não ser alterada é importante do ponto de vista epidemiológico, pois os mutantes não patogênicos exerceriam um controle biológico entre as demais bactérias.

## 7 - CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

- a - É possível, através da reação de hipersensibilidade em fumo e serologia, diferenciar colônias patogênicas de *Pseudomonas glycinea* das colônias de bactérias saprófitas fluorescentes.
- b - É possível detectar, através da morfologia da colônia bacteriana em meio de tetrazolium, diferenças no grau de patogenicidade entre os isolados de *Pseudomonas glyci - nea*. Tal não é possível através da reação de hipersensibilidade no fumo, indicando ser este método menos sensível que aquele.

- c - A produção de bacteriocina por diversos isolados de *Pseudomonas glycinea* e os diferentes padrões de sensibilidade dos mesmos às bacteriocinas produzidas permitem uma melhor caracterização dos isolados desta espécie.
- d - É possível diagnosticar rapidamente a doença do cretamento bacteriano da soja, através da serologia, pela detecção da presença de seu agente causal nos tecidos infectados do hospedeiro.
- e - Através do aquecimento do antígeno, é possível obter-se reação serológica mais nítida, bem como elevar o título do antígeno e antissoro.
- f - A resistência ao antibiótico estreptomicina normalmente afeta a patogenicidade, mas não tem efeito deletério sobre a capacidade bacteriocinogênica dos isolados de *Pseudomonas glycinea*.

## 8 - SUMMARY

Hypersensitive reaction on tobacco leaves, serology and tetrazolium medium were tested for identifying pathogenic isolates colonies of *Pseudomonas glycinea*. The bacteriocin production by thirteen wild types and some antibiotics mutants isolates were also investigated.

Both hypersensitivity reaction and serology were useful to distinguish the pathogen from saprophytic fluorescent bacteria. Two colony types were observed when bacterial suspension from stock cultures were streaked on a medium containing tetrazolium chloride. One was a weakly pathogenic red colony with a narrow white border and diameter from 1,5 mm to 2,5 mm (type I) , and the other was a highly pathogenic red to pink center colony with a large white border and diameter from 1,0 mm to 2,0 mm (type II), tested on soybean cv. Santana.

Five of 13 *Pseudomonas glycinea* isolates produced bacteriocins, although this characteristic was not related to serological reaction.

Antibiotics sensitivity of all different isolates estimated as maximum non inhibitory concentration (MNIC) was: 4,0 - 8,0  $\mu\text{g/ml}$  to kasugamycin , 0,16 - 0,32  $\mu\text{g/ml}$  to streptomycin and tetracyclin and 0,02 - 0,04  $\mu\text{g/ml}$  do terramycin. Resistant mutants to streptomycin (250 - 500  $\mu\text{g/ml}$  MNIC) obtained "in vitro" were affected on pathogenicity but not in its bacteriocinogenic capacity.

## 9 - LITERATURA CITADA

- AZEVEDO, J. L., 1961. Resistência e mutação de *Xanthomonas campestris* (Pam.) Dowson, em relação a alguns antibióticos. Piracicaba, ESALQ/USP, 48 p. (tese de doutoramento).
- AZEVEDO, J. L., 1973. Resistência aos antibióticos em bactérias fitopatogênicas. Ciência e Cultura, 25: 326-329.
- AZEVEDO, J. L., 1977. Tópicos de genética microbiana e molecular. Genética de Procariotos, Piracicaba, 207 p.
- BERGAMIN FILHO, A. ; H. KIMATI e J. L. AZEVEDO, 1975. O conceito de força de drogas. Summa Phytopathologica, 1: 31-42.
- BERGEY, D. H. ; R. S. BREED ; E. G. D. MURRAY e A. P. HITCHENS, 1939. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 5<sup>a</sup> eds. Baltimore: The Williams & Wilkins Company. 1032 p.

- BITTANCOURT, A. A., 1934. Relação das doenças e fungos parasitas observados na Secção de Fitopatologia durante os anos de 1931 e 1932. Arq. Instituto Biológico, 5: 185-186.
- BRADBURY, J. F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. Rev. Plant. Path., 49: 213-218.
- BRADLEY, D. E., 1967. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. Bacteriol. Rev., 31: 230-314.
- BROWN, A. G. e A. M. BOYLE, 1944. Penicillin treatment of crown gall. Science, 100: 528.
- BRYSON, V. e W. SZYBALSKI, 1957. Microbiol drug resistance. Advances in Genetics, 7: 1-47.
- CARROL, R. B. e F. L. LUKEZIC, 1971. Methods of preservation of *Corynebacterium insidiosum* isolates in relation to virulence and colony appearance on tetrazolium chloride medium. Phytopathology, 61: 1423-1425.
- CHO, Y. S. e Y. H. YOO, 1977. Studies on bacterial diseases of soybean. Korean Journal of Plant Protection, 16: 47-53.
- COERPER, F. M., 1919. Bacterial blight of soybean. J. Agric. Res., 18: 179-194.
- COOK, A. A., 1971. Alteration of hypersensitivity in plants to bacterial infection. Proceedings of the Third International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. p. 171-178.

- CUPPELS, D. A. ; R. S. HANSON e A. KELMAN, 1978. Isolation and characterization of a bacteriocin produced by *Pseudomonas solanacearum*. J. Gen. Microbiol., 109: 295-303.
- DAVIS, B. D. ; R. DULBECCO ; H. N. EISEN ; H. S. GINSBERG e W. B. WOOD JR., 1973. Microbiologia: infecções bacterianas e micóticas. Vol. 3. Traduz. R. A. A. MOURA. São Paulo, Edart. São Paulo Livraria Editora Ltda., 415 p.
- DE BOER, S. H. ; A. QUAIL e C. CROWLEY, 1979. Serological relationships and bacteriocin sensitivity among *Erwinia carotovora* serogroups. Phytopathology, 69: 1026 (Abstr.).
- DEKKER, J., 1963. Antibiotics in the control of plant diseases. Ann. Rev. Microbiol., 17: 243-262.
- DEMEREK, M., 1948. Origin of bacterial resistance to antibiotics. J. Bacteriol., 56: 63-74.
- DE VAY, J. E. ; F. L. LUKEZIC ; S. L. SINDEN ; H. ENGLISH e D. L. COPLIN, 1968. A biocide produced by pathogenic isolates of *Pseudomonas syringae* and its possible role in the bacterial canker disease of peach trees. Phytopathology, 58: 95-101.
- DOUDOROFF, M. e N. J. PALLERONI, 1974. Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. In: BUCHANAN, R. E. e N. E. GIBBSONS, eds. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8<sup>a</sup> ed., Baltimore, Williams & Wilkins Company, p. 217-243.
- ECHANDI, E., 1975. Biological control of bacterial canker of tomato with bacteriocins from *Corynebacterium michiganense*. Abstr. Ann. Meet. Am. Phytopathol. Soc., 154: 10-14.

- ECHANDI, E., 1976. Bacteriocin production by *Corynebacterium michiganense*. Phytopathology, 66: 430-432.
- ECHANDI, E. e J. W. MOYER, 1979. Production, properties and morphology of bacteriocins from *Erwinia chrysanthemi*. Phytopathology, 69: 1204-1207.
- ECHEGARAY, A., 1958. Los antibioticos en el control de las bacterias fitopatogenas. Escuela Nacional de Agricultura. México, p. 463-469.
- ELROD, R. P., 1941. Serological studies of the *Erwiniae* I. *Erwiniae amylovora*. Bot. Gaz., 103: 123-131.
- ELROD, R. P. e A. C. BRAUN, 1947. Serological studies of the genus *Xanthomonas* I. Cross-aggutination relationships. J. Bacteriol., 53: 509-518.
- FERREIRA, L. P., 1971. Nota prèvia sobre a ocorrência do doenças em soja (*Glycine max* (L.) Merrill) no Rio Grande do Sul. Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 4: 7-9.
- FERREIRA, L. P., 1978. *Pseudomonas glycinea* Coerper: Ocorrência e variabilidade. Piracicaba. ESALQ/USP. 47 p. (Tese de Mestrado).
- FIGUEIREDO, M. B., 1972. Estudos fisiologicos e serologicos sobre o fungo *Aschochyta phaseolorum* Sacc. e sobre a doença por ele causada em beringela (*Solanum melogena* L.) e em outras plantas cultivadas. Piracicaba, ESALQ/USP, 130 p. (Tese de Mestrado).

- FREDERIQ, P., 1948. Actions antibiotiques réciproques chez les Enterobacteriaceae. In: REEVES, P., 1972. The Bacteriocins. Molecular Biology Biochemistry and Biophysics. New York, Springer Verlag, 142 p.
- FREDERIQ, P., 1957. Colicins. Ann. Rev. Microbiol., 11: 7-22.
- FRIEDMAN, B. A., 1953. Serological tests with some phytopathogenic species of *Pseudomonas*. Phytopathology, 43: 412-414.
- FRIEDMAN, B. A., 1964. Carbon source and tetrazolium agar to distinguish virulence in colonies of *Erwinia carotovora*. Phytopathology, 54: 494-495.
- FULTS, J. L. ; L. A. SCHAAL e M. E. MICHAELSON, 1948. Value of the 2, 3, 5 - Triphenil Tetrazolium chloride reaction and ultraviolet light in parasitism studies of strains of *Actinomyces scabies* (Thaxt.) Guss. Proc. Soil Sci. Soc. Amer., 13: 287-291.
- GARRET, C. M. E. ; C. G. PANAGOPOULOS e J. E. CROSSE, 1966. Comparasion of plant pathogenic *Pseudomonas* from fruit tress. J. Appl. Bacteriol., 29: 342-356.
- GILLES, R. R. e J. R. W. GOVAN, 1966. Typing of *Pseudomonas pyocyanea* by pyocine production. J. Path. Bact., 91: 339-345.
- GILLIVER, K., 1946. The inhibitory action of antibiotics on plant pathogenic bacteria and fungi. Annals of Botany, 10: 271-282.

- GOLDSWORTHY, M. C., 1928. The production of agglutinins by phytopathogenic bacteria. Phytopathology, 18: 277-280.
- GOVAN, J. R. W. e R. R. GILLES, 1969. Further studies in the pyocine typing of *Pseudomonas pyocyanea*. J. Microbiol., 2: 17-25
- GROSS, D. C. e A. K. VIDAVER, 1979. Bacteriocins of phytopathogenic *Corynebacterium* species. Can. J. Microbiol., 25: 367-374.
- GUTHRIE, J. W., 1968. The serological relationships of races of *Pseudomonas phaseolicola*. Phytopathology, 58: 716-717.
- GUTHRIE, J. W. ; D. M. HUBER e H. S. FENWICK, 1965. Serological detection of halo blight. Plant Dis. Repr., 49: 297-299.
- HAMON, Y. ; M. VÉRON e Y. PERON, 1961. Contribution à l'étude des propriétés lysogènes et bacteriocinogènes dans le genre *Pseudomonas*. Ann. Inst. Pasteur, 101: 738-753.
- HELINSKI, D. R., 1973. Plasmid determined resistance to antibiotics: molecular properties of R factors. Ann. Rev. Microbiol., 27: 437-470.
- HTAY, K. e A. KERR, 1974. Biological control fo crown gall: seed and root inoculation. J. Appl. Bacteriol., 37: 525-530.

- HUDDLESON, F. e B. BALTZER, 1950. Differentiation of bacterial species and variation within species by means of 2, 3, 5 - Triphenyltetrazolium Chloride in culture medium. Science, 112: 651-652.
- IIDA, W., 1975. On the tolerance of plant pathogenic fungi and bacteria to fungicides in japan. Japan Pesticide Information, 23: 13-16.
- IVÁNOVICS, G., 1962. Bacteriocins and bacteriocin-like substances. Bacteriol. Rev., 26: 108-118.
- JACOB, F. ; A. LWOFF ; L. SIMINOVITCH e E. WOLMAN, 1953. Définition de quelques termes relatifs a la lysogénie. Ann. Inst. Pasteur, 84: 222-224.
- JACOB, F. ; L. SIMINOVITCH e E. WOLLMAN, 1952. Sur la biosynthésis d'une colicine et sur son mode d'action. Ann. Inst. Pasteur, 83: 295-315.
- JAVAID, I. e M. ASHRAF, 1978. Some observations on soybean diseases in Zambia and occurrence of *Pyrenochaeta glycinea* on certains varieties. Plant Dis. Repr., 62: 46-47.
- JOHNSON, A. G. e F. M. COERPER, 1917. A bacterial blight of soybean. Phytopathology, 1: 65 (Abstr.).
- KELMAN, A., 1954. The relationships of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology, 44: 693-695.
- KELMAN, A. e J. H. JENSEN, 1951. Maintaining virulense in isolates of *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology, 41: 185-186.

- KERR, A., 1972. Biological control of crown gall: seed inoculation. J. Appl. Bacteriol., 35: 493-497.
- KIMATI, H., 1975. Taxonomia, esporulação e patogenicidade de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wals. (Sensu Arx, 1957). Piracicaba, ESALQ/USP. 103 p. (Tese de Livre-docência).
- KING, E. O. ; M. K. WARD e D. E. RANEY, 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. J. Lab. & Clin. Med., Atlanta, G.A., U.S.A., 44: 301-307.
- KLEMENT, Z., 1963. Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic *Pseudomonas* . Nature, 199: 299-300
- KLEMENT, Z., 1971. Development of the hypersensitivity reaction induced by plant pathogenic bacteria. Proceedings of the Third International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. p. 157-164.
- KLEMENT, Z. ; G. L. FARKAS e L. LOVREKOVICH, 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. Phytopathology, 54: 474-477.
- KLEMENT, Z. e R. N. GOODMAN, 1967. The role of the living bacterial cell and induction time in the hypersensitive reaction of the tobacco plant. Phytopathology, 57: 322-323.
- KLEMENT, Z. e L. LOVREKOVICH, 1961. Defense reaction induced by phytopathogenic bacteria in bean pods. Phytopathology, 41: 217-227.

- KLEMENT, Z. e L. LOVREKOVICH, 1962. Studies on host-parasite relations in beans pods infected with bacteria. Phytopathol. Z., 45: 81-88.
- KOPPER, P. H., 1952. Studies on bacterial reducing activity in relation to age of culture. J. Bacteriol., 63: 639-645.
- LACY, G. H. e J. V. LEARY, 1975. Transfer of antibiotic resistance plasmid RP 1 into *Pseudomonas glycinea* and *Pseudomonas phaseolicola* in vitro and in plant. J. Gen. Microbiol., 88: 49-57.
- LEBEN, C., 1972. The development of a seletive medium for *Pseudomonas glycinea*. Phytopathology, 62: 674-676.
- LEBEN, C. ; G. C. DAFT e A. F. SCHMITTHENNER, 1968. Bacterial blight of soybean: population levels of *Pseudomonas glycinea* in relation to symptom development. Phytopathology, 58: 1143-1146.
- LEBEN, C. ; V. RUSCH e A. F. SCHMITTHENNER, 1968. The colonization of soybeans buds by *Pseudomonas glycinea* and other bacteria. Phytopathology, 58: 1677-1681.
- LEHMAN, P. S. ; C. C. MACHADO e M. T. TARRAGO, 1976. Frequên<sup>ca</sup> e severidade de doenças da soja nos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Fitopatologia Brasileira, 1: 183-193.
- LEITE, A. F. e A. R. OLIVEIRA, 1975. Furagar. Summa Phytopathologica, 1: 143-146.

- LELLIOT, R. A. ; E. BILLING e A. C. HAYWARD, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. J. Appl. Bacteriol., 29: 470-489.
- LEMONS, M. A., 1969. Comportamento de mutantes de *Xanthomonas campestris* (Pam.) Dowson resistentes à aureomicina e à estreptomicina em relação ao tratamento de sementes de repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) com esses antibióticos. Piracicaba, ESALQ/USP. 60 p. (Dissertação de Mestrado).
- LITKENHOUS, C. e P. V. LIU, 1967. Bacteriocin produced by *Bordetella pertussis*. J. Bacteriol., 93: 1484-1488.
- LOVREKOVICH, L. e H. LOVREKOVICH, 1970. Tissue necrosis in tobacco caused by a saprophytic bacterium. Phytopathology, 60: 1279-1280.
- LOZANO, J. C. e L. SEQUEIRA, 1970. Differentiation of races of *Pseudomonas solanacearum* by leaf infiltration technique. Phytopathology, 60: 833-838.
- LUCAS, L. T. e R. G. GROGAN, 1969. Serological variation and identification of *Pseudomonas lachrymans* and other phytopathogenic *Pseudomonas* nomenspecies. Phytopathology, 59: 1908-1912.
- MATTSON, M. A. ; O. C. JENSEN e R. A. DUTCHER, 1947. A triphenyl tetrazolium chloride as a dye for vital tissues. Science, 106: 294-295.

- MAYR-HARTING, A. ; A. J. HEDGES e R. C. W. BERKELEY, 1972. Methods for studying bacteriocins. In: NORRIS, J. R. e D. W. RIBBONS. Methods in Microbiology. New York, Academic Press, Vol. 7 A, p. 315-422.
- MAZZUCHI, U., 1975. Vascular blackening in sugar beet taproots caused by *Pseudomonas syringae* Van Hall. Phytopathol. Z., 84: 289-299.
- MEHTA, P. P. ; D. GOTTLIEB e D. POWELL, 1959. Vancomycin, a potential agent for plant disease prevention. Phytopathology, 49: 177-183.
- MISAGHI, I. e R. G. GROGAN, 1969. Nutritional and biochemical comparisons of plant pathogenic and saprophytic fluorescent *Pseudomonas*. Phytopathology, 59: 1436-1450.
- MOORE, L. W., 1979. *Agrobacterium radiobacter* strain 84 and biological control of crown gall. Ann. Rev. Phytopathol., 17: 163-179.
- MORTON, D. J. ; P. D. DUKES e S. F. JENKIS JR., 1965. Serological identification of *Pseudomonas solanacearum* in four solanaceous host. Phytopathology, 55: 1191-1193.
- MORTON, D. J. ; P. D. DUKES e S. F. JENKIS JR., 1966. Serological relationship of races 1, 2 and 3 of *Pseudomonas solanacearum*. Plant Dis. Repr., 50: 275-277.
- MULLER, K. O., 1959. Hypersensitivity. In: HORSFALL, J.G. e A. E. DIMOND, Eds.. Plant Pathology. New York, Academic Press., Vol. 1, p. 469-519.

- MUNOZ, J. ; M. SCHERAGO e R. H. WEAVER, 1949. A serological study of members of the *Pseudomonas* genus. J. Bacteriol., 57: 269-278.
- NAMEKATA, T., 1971. Estudos comparativos entre *Xanthomonas citri* (Hasse) Dow., agente causal do "Cancro Cítrico" e *Xanthomonas citri* (Hasse) Dow NF. SP. aurantifolia, agente causal da "Cancrose do Limoeiro Galego". Piracicaba, ESALQ/USP. 65 p. (Tese de Doutorado).
- NELSON, G. A. e G. SEMENIUK, 1964. An antagonistic variant of *Corynebacterium insidiosum* and some properties of the inhibitor. Phytopathology, 54: 330-335.
- OKABE, N. e M. GOTO, 1963. Bacteriophages of plant pathogens. Ann. Rev. Phytopathol., 1: 397-418.
- OLIVEIRA, A. R., 1967. Serologia aplicada ao estudo do vírus do anel do pimentão. Piracicaba, ESALQ/USP, 40 p. (Tese de Doutorado).
- OTTA, J. D. e H. ENGLISH, 1971. Serology and pathology of *Pseudomonas syringae*. Phytopathology, 61: 443-452.
- PAGANO, J. ; J. D. LEVIN e W. TREJO, 1958. Diagnostic medium for differentiation of species of *Candida*. Antibiotics Annual, 1957-1958: 137-143.
- PANAPOULOS, N. J. ; W. V. GUIMARÃES ; J. J. CHO e M. N. SCHROTH, 1975. Conjugative transfer of *Pseudomonas aeruginosa* R. factors to plant pathogenic *Pseudomonas* spp. Phytopathology, 65: 380-388.

- PRADO FILHO, L. G., 1975. Emprego de antibióticos na agricultura. In: LACAZ, C. S. Antibióticos. São Paulo, Edgard Blucher Editora, 3.<sup>a</sup> ed., p. 472-509.
- QUADLING, C., 1960. Mutation conferring streptomycin resistance in *Xanthomonas phaseoli*. Can. J. Microbiol., 6: 387-396.
- REEVES, P., 1965. The bacteriocins. Bacteriol. Rev., 29: 24-45.
- SANDS, D. C. ; M. N. SCHROTH e D. C. HILDEBRAND, 1970. Taxonomy of Phytopathogenic Pseudomonads. J. Bacteriol., 101: 9-23.
- SANTOS, M. M. L. S., 1979. Produção de bacteriocinas e resistência a antibióticos em *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson. Piracicaba, ESALQ/USP. 81 p. (Tese de Mestrado).
- SCHAAD, N. W., 1979. Serological identification of plant pathogenic bacteria. Ann. Rev. Phytopathol., 17: 123-147.
- SCHNITZER, R. J. e E. GRUMBERG, 1957. Drug resistance of microorganism. New York, Academic Press, 395 p.
- SCHUCK, E., 1973. Ocorrência de bacteriose em soja (*Glycine Max* (L.) Merrill no Rio Grande do Sul. Agronomia Sulriograndense, 9: 27-32.
- SEELIGER, H. P. R., 1968. Serology as an aid to taxonomy. In: AINSWORTH, C. G. e A. S. SUSSMAN, Eds. The Fungi, An Advance Treatise, 3: The Fungal Population. New York, Academic Press, p. 597-624.

- SINCLAIR, J. B., 1977. Infections soybean diseases of world importance. Pans, 23: 49-57.
- SINCLAIR, J. B. e M. C. SHURTLEFF, 1975. Compendium of soybean diseases. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 69 p.
- SHAFFER, W. H. Jr. e R. N. GOODMAN, 1962. Progression in vivo, rate of growth in vitro and resistance to streptomycin as indices of virulence of *Erwinia amylovora*. Phytopathology, 52: 1201-1207.
- SHATTOCK, P. M. F., 1955. The use of serology in the classification of microorganisms. J. Gen. Microbiol., 12: 367-374.
- SHEKHAWAT, P. S. e B. P. CHAKRAVARTI, 1977. Serological tests to find out antigenic differences among isolates of *Xanthomonas vesicatoria* (Doidge) Dowson abd some other phytopathogenic bacteria. Cur. Sci., 46: 46-47.
- SHUNK, I. V. e F. A. WOLF, 1921. Further studies on bacterial bligh of soybean. Phytopathology, 11: 18-24.
- SMALE, B. C. e J. F. WORLEY, 1956. Evaluation of 2, 3, 5 - trifeny tetrazolium chloride for obtaining pathogenic types from stock cultures of halo blight and common blight organisms. Plant Dis. Repr., 40: 628.
- STANGHELLINI, M. E. ; D. C. SANDS ; W. G. KRONLAND e M. M. MENDONÇA, 1977. Serological and physiological differentiation among isolates of *Erwinia carotovora* from potato and sugarbeet. Phytopathology, 67: 1178-1182.

- STARR, M. P., 1959. Bacteria as plant pathogens. Ann. Rev. Microbiol., 13: 211-238.
- STOLP, H., 1961. Fresh data on phytopathogenic bacteria and the diseases caused by them. I. Relationships between phytopathogenic *Pseudomonas* species and aprophytic fluorescentes on the basis of phage reactions. Phytopathol. Z., 42: 197-262.
- STONIER, T., 1960. *Agrobacterium tumefaciens* Con. II. Production of an Antibiotic Substance. J. Bacteriol., 79: 889-898.
- TAGG, J. R. ; A. S. DAJANI e L. W. WANNAMAKER, 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Bacteriol. Rev., 40: 722-756.
- TAYLOR, J. D., 1972. Specificity of bacteriophages and anti serum for *Pseudomonas pisi*. N. Z. J. Agric. Res., 15: 421-431.
- THIRUMALACHAR, M. J. ; M. K. PATEL ; N. B. KULKARNI e G. H. DHAND, 1956. Effects "in vitro" of some antibiotics on thirty-two *Xanthomonas* species occurring in India. Phytopathology, 46: 486-488.
- THORNLEY, M. J., 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other gram-negative bacteria on the basis of argine metabolism. J. Appl. Bacteriol., 23: 37-52.
- TRABULSI, L. R., 1973. Aspectos m\u00e9dicos da resist\u00eancia bacteriana \u00e0 drogas. Revista de Microbiologia, Suplemento especial.

- TUITE, J., 1969. Plant Pathological Methods. Fungi and Bacteria. Minn. USA. Burgess Publ. Co., 239 p.
- TURNER, J. G. e A. NOVACKY, 1974. The quantitative relation between plant and bacterial cells involved in the hypersensitive reaction. Phytopathology, 64: 885-890.
- VIDAVER, A. K., 1976. Prospects for control of phytopathogenic bacteria by bacteriophages and bacteriocins. Ann. Rev. Phytopathol., 14: 451-465.
- VIDAVER, A. K. ; M. L. MATHIS ; M. E. THOMAS e M. L. SCHUSTER, 1972. Bacteriocins of the phytopathogens *Pseudomonas syringae* , *P. glycinea* and *P. phaseolicola*. Can. J. Microbiol., 18: 705-713.
- WATANABE, T., 1972. Infectious drug resistance in bacteria. Current Topics in Microbiology and Immunology, 56: 43-98.
- WOLF, F. A., 1920. Bacterial blight of soybean. Phytopathology, 10: 119-132.
- YAKRUS, M. e N. W. SHAAD, 1979. Serological relationships among strains of *Erwinia chrysanthemi*. Phytopathology , 69: 517-522.
- YONG, J. M. ; D. W. DYE ; J. F. BRADBURY ; C. G. PANAGOPOULOS e C. F. ROBBS, 1978. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. N. Z. J. Agric. Res., 21: 153-177.

YULE, R. e B. D. BARRIDGE, 1976. Isolation and characterization of a bacteriocin produced by *Bacillus stearothermophilus* strain NU - 10. Can. J. Microbiol., 22: 1743-1750.