

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA

Diretor: Prof. Dr. Metry Bacila

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Xanthomonas campestris*  
PARA RESISTÊNCIA À ESTREPTOMICINA E À  
ERITROMICINA

(GENETIC TRANSFORMATION OF *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* TO  
STREPTOMYCIN AND ERYTHROMYCIN RESISTANCE)

SÉRGIO OLAVO PINTO DA COSTA  
Instrutor

INTRODUÇÃO

Transformação é um processo de transferência de informação genética, na qual uma fração do ácido desoxirribonucleico (DNA) da célula doadora obtida por extração química ou lise natural, pode penetrar numa célula bacteriana aparentada, substituindo aí, através processo de recombinação, uma seqüência de nucleotídeos do genoma da célula receptora. Se a seqüência de nucleotídeos derivada da célula doadora difere, em parte, da seqüência de nucleotídeos da célula receptora, proverá para a célula "transformada" e sua progenia uma nova informação para o caráter controlado por essa região do DNA (para revisão veja AUSTRIAN, 1952; EPHRUSSI-TAYLOR, 1955; HOTCHKISS, 1955; RAVIN, 1961; THOMAS 1962; SHAEFFER, 1964; BRAUN, 1965 e SPIZIZEN *et al.*, 1966).

Transferência de fatores genéticos por transformação tem sido relatada em várias bactérias (GRIFFITH, 1928; DAWSON e WARBASSE, 1931; ALEXANDER e LEIDY, 1950; ALEXANDER e REDMAN, 1953; COREY e STARR, 1957; SPIZIZEN, 1958; SLADE e PERRY, 1960 e SPARTING, 1966). Como em *Xanthomonas campestris* não foi descrito ainda nenhum processo de recombinação gênica, procura-se transferir por transformação fatores responsáveis pela resistência bacteriana à estreptomicina e eritromicina.

## MATERIAL E MÉTODOS

1) *Linhagem selvagem*. O isolamento foi efetuado de material enegrecido de vasos de caule de couve (*Brassica oleraceae* var. *acephala*), a indentificação obedeceu as normas ditadas pelo Manual of Microbiological Methods e sua classificação seguiu as determinações do Bergey's Manual of Determinative Bacterology como segue: Bacilos retos, isolados, medindo 0,3 — 0,4  $\mu$  de largura por 1 — 3 u de comprimento. Coloração negativa pelo Gram, móveis, flagelo presente em posição polar, ausência de esporos. Produção de gás sulfídrico, prova da catalase positiva, amido fortemente hidrolisado, nitrato não reduzido, produção fraca de indol, prova do vermelho de metila e Voges-Proskauer negativas. A ação sobre os carboidratos: glicose, sacarose, lactose e manitol se deu com acidificação e sem produção de gás. Crescimento a 28°C no caldo nutritivo adicionado de 0,2% de glicose: bom, turvando todo meio com formação de sedimento no fundo. Crescimento a 37°C, nulo. As colônias em agar nutritivo, circulares, bordos lisos, brilhantes e de cor amarela.

As linhagens foram mantidas em estoque no meio agar YDC (COREY e STARR, 1953<sup>a</sup>), sugerido para *Xanthomonas phaseoli*, constituído de 1% de extrato de leveduras; 2% de glicose; 2% de carbonato de cálcio e 2% de agar.

Transferências mensais mantiveram as linhagens em estado satisfatório para os ensaios.

2) *Linhagens resistentes à estreptomicina*. Suspensão de 0,1 ml contendo  $9 \times 10^{10}$  bactérias, cultivadas em caldo nutritivo Lab-Lemco Broth-Oxoid, adicionado 1% de extrato de levedura e 2% de glicose, foi semeada em 20 placas contendo 20 ml de agar nutritivo (Lab-Lemco Agar-Oxoid) adicionado de 100  $\mu\text{g/ml}$  de sulfato de estreptomicina (Squibb Indústria Química) e incubadas por 120 horas a 28°C. Colônias foram transferidas pela técnica da réplica (LEDERBERG e LEDERBERG, 1952), para placas contendo 20 ml de agar nutritivo, adicionado de quantidades crescentes de estreptomicina.

3) *Linhagens resistentes à estreptomicina e à eritromicina*. Suspensão de 0,1 ml contendo  $5,6 \times 10^{11}$  bactérias resistentes à estreptomicina, cultivadas em caldo glicosado foi semeada em 10 placas contendo 20 ml de agar nutritivo, adicionado de 25  $\mu\text{g/ml}$  de eritromicina (para uso exclusivo de investigação — Eli Lilly & Co. U.S.A.) e incubadas por 120 horas a 28°C. Colônias que desenvolveram crescimento nessas placas foram transferidas, pela técnica da réplica, para placas contendo 20 ml de agar nutritivo adicionado de quantidades crescentes de eritromicina.

4) *Extração do ácido desoxirribonucleico.* O método utilizado foi de MARMUR (1961). As células são inicialmente rompidas, os restos celulares e proteínas removidas por desnaturação e centrifugação, logo o RNA é removido pela RNase e a precipitação seletiva do DNA é executada pelo isopropanol. A degradação pela DNase e a presença de quelantes são evitadas pela ação do lauril sulfato de sódio (Duponol).

a) *Reativos:*

1) *Solução salina-EDTA.* Salina 0,15 M mais EDTA 0,1 M, pH 8,0.

2) *Lauril sulfato de sódio (Duponol) 25%.*

3) *Percloroeto de sódio 5 M.*

4) *Clorofórmio-álcool isoamílico 24:1 (V/V).*

5) *Álcool etílico 95%.*

6) *Solução salina-citrato.* Salina 0,15 M mais 0,015 M de citrato trissódico, pH 7,0.

7) *Solução salina-citrato diluída.* Salina 0,015 M mais 0,0015 M de citrato trissódico.

8) *Solução salina-citrato concentrada.* Salina 1,5 M mais 0,15 M de citrato trissódico.

9) *RNase* (Ribonuclease cristalizada — Mann Research Laboratories Inc. N. York — N.Y.) 0,2% em salina 0,15 M, pH 5,0. A solução é aquecida a 80°C por 10 minutos, a fim de inativar qualquer DNase contaminante.

10) *Solução acetato-EDTA.* Solução de acetato de sódio 3 M mais EDTA 0,001 M.

b) *Procedimento*

A técnica é utilizada para 2-3 g de células úmidas. Todas as operações podem ser conduzidas em temperatura ambiente exceto a operação com RNase que deve ser feita a 37°C. Bactérias na fase logarítmica de crescimento são centrifugadas à velocidade de 5.000 a 10.000 rpm (3.000 a 13.000 x g) e lavadas uma vez com 50 ml de salina-EDTA. Após a centrifugação elas são ressuspensas em 25 ml de salina-EDTA. A lise é feita adicionando 2 ml de lauril sulfato de sódio e a mistura colocada em banho-maria a 60°C por 10 minutos e então esfriada à temperatura ambiente. A lise da cultura resulta em grande aumento da viscosidade, com a libertação dos ácidos nucleicos. Percloroeto de sódio é adicionado

à concentração final de 1 M na suspensão viscosa e toda a mistura é agitada suavemente com igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico, suavemente por 30 minutos. A emulsão resultante é separada em 3 camadas por centrifugação a 5.000 — 10.000 rpm, durante 5 minutos. A camada superior contém os ácidos nucleicos e é cuidadosamente pipetada para tubo ou frasco estreito. Os ácidos nucleicos são precipitados adicionando-se, com cuidado 2 volumes de álcool etílico, formando duas camadas. Quando essas camadas são suavemente misturadas com bastão de vidro, os ácidos nucleicos enrolam-se no bastão de vidro em forma fibrosa e são facilmente removidos. O precipitado é livrado do excesso de álcool, pressionando-se o bastão na parede do tubo. O precipitado é então transferido para aproximadamente 10 a 15 ml de salina-citrato diluída, e removido através de movimentos suaves. A solução é ajustada para a concentração padrão de salina-citrato, adicionando-se solução salina-citrato concentrada, agitando-se com igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico por 15 minutos, centrifugando-se e removendo-se a seguir o sobrenadante. A desproteinização é repetida com clorofórmio-álcool isoamílico, como já descrito, até que pouca proteína seja vista na interfase. O sobrenadante obtido é precipitado com álcool etílico e disperso em salina-citrato (cerca de 0,5 — 0,75 do volume do sobrenadante). RNase é adicionada em concentração final de 50 micrograma/ml e a mistura incubada por 30 minutos a 37°C. Após a digestão do RNA é possível remover as proteínas que resistiram às desproteinizações anteriores. O digerido é novamente submetido a uma série de desproteinizações até que pouca ou nenhuma proteína desnaturada seja visível na interfase, depois da centrifugação. O sobrenadante é novamente precipitado com álcool etílico e o ácido nucleico é dissolvido em 9,0 ml de solução salina-citrato diluída. Um ml da solução acetato-EDTA é adicionado. Enquanto a solução é rapidamente agitada, adiciona-se gota a gota 0,54 volume de álcool isopropílico. O DNA precipita numa forma fibrosa, passando, primeiramente, por uma fase de gel, com cerca de 0,5 volume de álcool isopropílico. RNA ou oligoribonucleotídeos e os polissacarídeos capsulares ou celulares permanecem em solução, enquanto o DNA é redissolvido e precipitado mais uma vez com isopropanol de maneira já descrita. O precipitado final é livrado de acetato e cloreto de sódio por agitação cuidadosa do precipitado, mergulhando sucessivamente o bastão em álcool de 70 a 90% e então dissolvido em solvente de escolha.

A fase final de precipitação seletiva do DNA pelo iso-propanol, separando-o dos polissacarídeos, foi abolida, uma vez que já foi verificada a não interferência dessas substâncias na atividade transformante do DNA (ZAMENHOFF, 1952).

Observando-se os cuidados mencionados, são obtidos até 50% do DNA das células. Em geral 1-2 mg de DNA são obtidos de 1,0 g de células úmidas. O DNA pode ser guardado em solução a 5°C na presença de algumas gotas de clorofórmio. Se é desejado o DNA livre de esporos pode ser esterilizado pela exposição ao álcool etílico a 70% por várias horas e então transferido a um solvente estéril.

5) *Curva de crescimento.* O número de bactérias viáveis por ml em diversos tempos de crescimento foi determinada, em caldo nutritivo (Lab-Lemco Broth-Oxoid), adicionado de extrato de leveduras 1% e glicose 2%, semeado com 1/500 do volume, com uma cultura de 18 horas de desenvolvimento ( $9,6 \times 10^4$  bactérias). As células foram então cultivadas por 81 horas, a 28°C com 160 rpm em agitador rotatório. Aliquotas foram retiradas de tempos em tempos, diluídas convenientemente e 0,1 ml e plaqueados em agar nutritivo. Em cada tempo observado, foi feita contagem de colônias, calculado o número de bactérias por ml, redução a uma bactéria, tomando-se em consideração o número de bactérias do tempo inicial (inóculo) e, finalmente, construída a curva de crescimento em função do tempo de cultivo em horas.

a) *Tempo de geração.* O cálculo de geração foi feito entre 24 e 54 horas da curva de viabilidade de bactérias (LAMANNA e MALLETT, 1953), dada pela fórmula:

$$N_f = N_i \times 2^n$$

sendo  $N_f$  = número de bactérias na 54.<sup>a</sup> hora de cultivo

$N_i$  = número de bactérias na 24.<sup>a</sup> hora de cultivo

$n$  = número de gerações

6) *Transformação bacteriana.*

a) *Competência das células receptoras.* A capacidade de tomar DNA exógeno e ser geneticamente transformável por êle, foi investigada em relação às flutuações de competência cíclica, em função da divisão celular, relatadas por HORTCHKISS (1954). Células crescidas em caldo glicosado enriquecido com extrato de levedura a 1% e glicose a 2%, testadas em vários pontos da curva de crescimento, que representassem: "lag-phase", fase logarítmica de crescimento e fase estacionária, com intervalos que correspondiam a 3 — 6 — 12 — 24 — 30 — 48 — 72 — 96 e 120 horas de cultivo de células receptoras. As amostras representativas desses vários tempos foram colhidas em duplicata a fim de manter estoque, células competentes para ensaios ulteriores. Para isso foram mantidas em caldo glicerinado a 10%, que corresponde a uma varia-

ção intermediária do processo de crescimento sincrônico de HOTCHKISS (1954), e da técnica da estocagem de linhagens competentes por congelamento (FOX e HOTCHKISS, 1963). Foram testados somente as marcas genéticas responsáveis pela resistência à estreptomicina.

O sistema transformante foi constituído de 2,7 ml da cultura e 0,2 ml da solução de DNA. Após uma geração a 28°C foi acrescentada DNase (Nutricional Biochemical Corporation, Cleveland, Ohio, cristalizada uma vez), conforme inicialmente empregado por (McCARTY *et al.*, 1946), a fim de limitar o tempo, durante o qual a cultura era exposta ao princípio transformante, utilizando-se 0,1 ml (0,01 mg/ml em solução salina-magnésio na base de 0,005 M de cloreto de magnésio), HOTCHKISS (1957), e deixada agir por 30 minutos em temperatura ambiente. Um tubo com sistema semelhante, onde DNA e DNase foram substituídos por salina 0,9% estéril, serviu de testemunha.

O número de bactérias contidas nos dois sistemas foi determinado, semeando-se diluições convenientes em placas de agar nutritivo incubado por 28°C e procedida a contagem de colônias; também 0,1 ml de cada sistema foi semeado em 15 placas contendo agar nutritivo, incubado a 28°C por 24 — 28 horas, e então transferido para igual número de placas contendo agar nutritivo adicionado de 500 µg/ml de estreptomicina. Essa transferência foi feita com o auxílio da técnica da réplica de LEDERBERG & LEDERBERG (1952). Após incubação a 28°C por 120 horas foi procedida a contagem das colônias mutantes à estreptomicina, selecionadas no sistema testemunha.

A freqüência de transformação foi expressa pela relação células transformadas (T) sobre células da população receptora (E) multiplicada por  $10^7$  (CATLIN, 1960). Percentagem de transformação foi calculada levando em consideração o número de células transformadas em relação ao número de células receptoras.

b) *Transformação bacteriana transferindo o caráter resistência à estreptomicina e à eritromicina.* Dois tubos contendo 2,7 ml de cultura estocada no refrigerador com caldo glicerinado a 10% com células competentes tiveram o sobrenadante substituído por caldo glicosado enriquecido e incubado por 3 horas a 28°C. Os dois sistemas, transformante e testemunha foram executados conforme descrito no item anterior.

Foram ensaiadas linhagens de *X. campestris* que haviam sido crescidas por 3 — 6 horas, e a seguir mantidas em estoque.

Transformação levando uma única marca, estreptomicina ou eritromicina ou dupla-transformações levando simultaneamente re-

sistência à estreptomicina e à eritromicina, foram anotadas e analisadas. A distinção entre dupla-transformação devido a dois eventos independentes, mas quase simultâneos, levando marcas não ligadas, e aquelas nas quais marcas ligadas participam, foi feita levando em consideração a frequência dos acontecimentos. Assim, num sistema no qual duas marcas não ligadas são empregadas, a frequência de células dupla-transformadas é igual ou frequentemente menor do que o produto da frequência dos transformantes únicos. (BRAUN, 1965).

#### RESULTADOS

1) *Linhagem resistente à estreptomicina.* Dez colônias mutantes foram selecionadas numa população de  $1,8 \times 10^{12}$  células semeadas em agar adicionado de  $100 \mu\text{g}$  de estreptomicina. Assim, foi isolada uma bactéria mutante em  $1,8 \times 10^{11}$  bactérias sensíveis à droga. Quatro colônias mostraram resistência a mais de 20 mg por ml de meio. Com exceção de uma que apresentou resistência a 5 mg/ml, todas as demais foram capazes de resistir a 10 mg da droga por ml de meio.

2) *Linhagem resistente à estreptomicina e à eritromicina.* Treze colônias mutantes foram selecionadas numa população de  $5,6 \times 10^{12}$  células, semeadas em agar adicionado de  $25 \mu\text{g}$  de eritromicina. Foi isolada uma bactéria mutada em  $4,3 \times 10^{11}$  bactérias sensíveis à droga. Dessa maneira, com exceção de 5 colônias que resistiram a  $500 \mu\text{g}$ , as demais restantes resistiram diretamente a 1 mg/ml de eritromicina. A linhagem escolhida para a extração de DNA foi uma das que combinou resistência de 20 mg/ml de estreptomicina com 1 mg/ml de eritromicina.

3) *Curva de crescimento.* Como mostra a fig. 1, está suprimida a fase estacionária inicial. A "lag-phase", compreendida entre 3 — 6 horas é substituída logo pela fase logarítmica de crescimento, que se prolonga até 48 — 57 horas, para aí então iniciar a fase estacionária.

4) *Tempo de geração.*

$$N_i = N_f \times 2^n$$

$N_f$  = número de bactérias na 54.<sup>a</sup> hora de cultivo

$N_i$  = número de bactérias na 24.<sup>a</sup> hora de cultivo

$n$  = número de gerações.

Assim,

$$9,75 \times 10^7 = 6,60 \times 10^{10} \times 2^n$$

$$n = 17,17 \text{ gerações (30 horas)}$$

$$1 \text{ geração} = 104,82 \text{ minutos}$$

5) *Transformação bacteriana.*

a) *Competência das células receptoras.* A localização do estado de competência celular, em transformação bacteriana às diversas fases do crescimento celular está demonstrada na Tabela I.

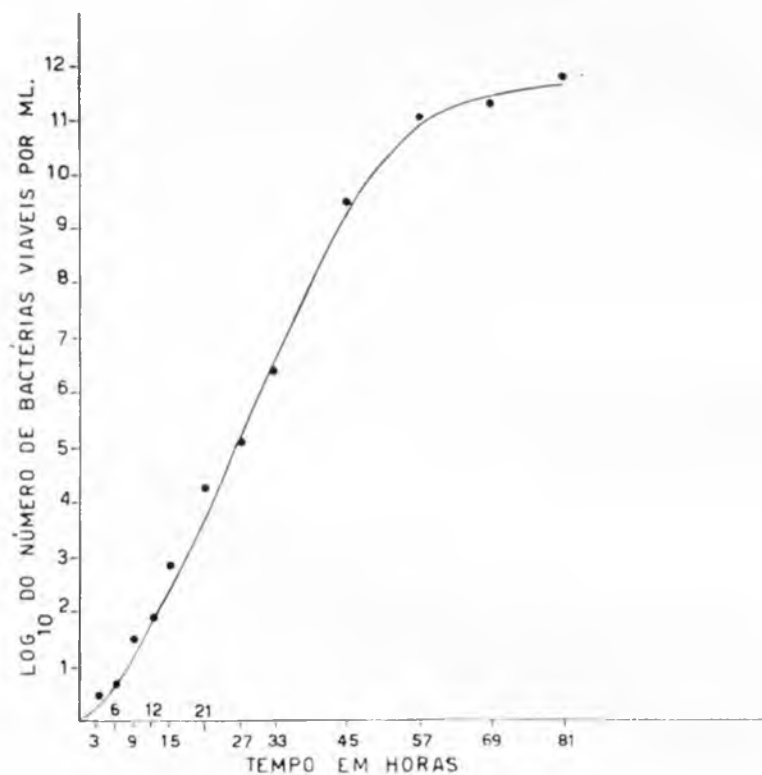


Fig. 1 — Curva de crescimento de *X. campestris* cultivada em caldo nutritivo (lab-Lemco Broth-Oxid) adicionado de extrato de levedura a 1%, glicose a 2% e carbonato de cálcio a 2%. Crescimento a 28°C, com agitação de 160 rpm. As quotas foram retiradas de tempos em tempos, diluídas e distribuídas em placas com agar nutritivo. Em ordenadas o logaritmo decimal do número de bactérias viáveis e em abscissas o tempo correspondente em horas. Os pontos resultam da média de duas repetições, da mesma cultura mantida a 5°C. A fase estacionária inicial está suprida. A fase logarítmica é relativamente curta.



TABELA 1 — Determinação da competência celular com relação à idade da cultura, em *Xanthomonas campestris*, após transformação genética levando a característica resistência à estreptomicina.

Tempo de cultivo (horas)	Células receptoras (E) *	Células transformadas (T) **	T/E x 10 <sup>5</sup> ***	Porcentagem de transformação
3	3,6 x 10 <sup>7</sup>	381	1 05	1,0 x 10 <sup>-3</sup>
6	3,0 x 10 <sup>8</sup>	42	1,4 x 10 <sup>-2</sup>	1,4 x 10 <sup>-5</sup>
12	9,0 x 10 <sup>8</sup>	26	2,9 x 10 <sup>-2</sup>	2,9 x 10 <sup>-6</sup>
24	1,5 x 10 <sup>9</sup>	10	6,6 x 10 <sup>-4</sup>	6,0 x 10 <sup>-9</sup>
30	1,5 x 10 <sup>11</sup>	2	1,3 x 10 <sup>-6</sup>	1,3 x 10 <sup>-9</sup>
48	2,1 x 10 <sup>12</sup>	19	9,0 x 10 <sup>-7</sup>	1,0 x 10 <sup>-10</sup>
72	5,5 x 10 <sup>12</sup>	11	2,0 x 10 <sup>-8</sup>	2,0 x 10 <sup>-11</sup>
96	1,9 x 10 <sup>14</sup>	3	1,5 x 10 <sup>-7</sup>	2,3 x 10 <sup>-11</sup>
120	1,3 x 10 <sup>12</sup>	0	0	0

\* Células receptoras (E) = População bacteriana semeada em 15 placas contendo agar adicionado de 500 µg de estreptomicina.

\*\* Células transformadas (T) = Células originadas na população receptora, com crescimento predominante, em relação às células mutantes espontâneas selecionadas na população testemunha. Referidas também como número de unidades formadoras de colônias transformadas.

\*\*\* Relação de células transformadas sobre células receptoras.

## DISCUSSÃO

1) *Linhagem resistente à estreptomicina.* Os mutantes selecionados com estreptomicina enquadram-se no modelo de resistência de "um único passo" (one step) de DEMEREC, (1948). Estudos sobre resistência em estafilococo (DEMEREC, 1945) e resistência à estreptomicina em *Escherichia coli* (DEMEREC, 1948) indicam que quando êles desenvolvem resistência, o fazem como um discreto e raro acontecimento, análogo às mutações que ocorrem em organismos superiores. Em algumas espécies, mutantes são caracterizados por vários níveis de resistência, e cada nível, aparentemente, desenvolve em um único passo (DEMEREC, 1948; SCHAEFFER, 1956; BRYAN, 1961; RAVIN e MISHRA, 1965).

2) *Linhagem resistente à estreptomicina e à eritromicina.* Os mutantes selecionados mostraram resistência do tipo “um único passo” (BRAUN, 1953), idêntico ao descrito para estreptomicina.

3) *Curva de crescimento.* É esperado que um inóculo grande de bactérias, surpreendidas na fase logarítmica de crescimento, forneça curva sem fase estacionária inicial evidente, como a aqui obtida (WATSON, 1965). A “lag-phase”, relativamente curta contrasta, com os dados de AZEVEDO (1961). Também o inóculo grande e a utilização de meio nutritivo diferente pode provavelmente justificar essa ocorrência. “Lag-phase” curta, seguida de crescimento exponencial contrasta com a curta duração da fase logarítmica (57 horas) comparando com os achados de AZEVEDO (1961) que obteve fase logarítmica próxima de 70 horas.

4) *Tempo de geração.* A ocasião mais apropriada para transformação ocorrer é exatamente após a divisão celular (DAVIDSON, 1965). No meio de cultura utilizado neste trabalho, a população bacteriana leva 104-82 minutos para dobrar o seu número. Esse tempo de divisão celular é um pouco maior do que o obtido por AZEVEDO (1961), que deu próximo de 94 minutos e de MASON (1935) com 78 minutos no caldo glicosado e 98 minutos no caldo simples. Esse tempo um tanto alongado está de acôrdo com o tipo curto de fase logarítmica obtida.

#### 5) *Transformação bacteriana.*

a) *Competência das células receptoras.* Como se pode verificar na Tabela I, o maior número de células transformadas ocorre no período de 3 — 6 horas de crescimento bacteriano, abrangendo portanto a “lag-phase” e início da fase logarítmica. Esse fato nos leva a supor que a competência máxima esteja compreendida nesse período do crescimento bacteriano. COREY e STARR (1957<sup>11</sup>), trabalhando com *Xanthomonas phaseoli*, conduziram seus experimentos de transformação na fase logarítmica, apesar de não terem investigado o ponto de maior competência. Contudo, células receptoras de *Bacillus subtilis*, *Pneumococcus* e *Hemophilus* alcançam a máxima competência em condições nas quais as células não estão se multiplicando rapidamente (MAC-CARTY *et al.*, 1946; ALEXANDER e LEIDY, 1953; ANAGNOSTOPOULOS e SPIZIZEN, 1961; STEINY, 1962). Trabalhando com *Hemophilus influenzae*, ALEXANDER *et al.*, (1954) verificaram que durante o período logarítmico de crescimento, quando a população aumenta 100 vezes, há marcado decréscimo na freqüência de células suscetíveis. O pico de competência é alcançado no início da fase estacionária, com posterior

decréscimo. Para SPARTING (1966), a competência máxima em *Neisseria gonorrhoeae*, ocorre na "lag-phase" e início da fase logarítmica.

O resultado obtido em 30 horas onde ocorre aparente discrepância, não pode ser explicado. É possível que tenha sido ocasionado por problema de ordem técnica.

b) *Transformação bacteriana transferindo o caráter resistência à estreptomicina e à eritromicina.* Células com crescimento sincronizado e em estado de competência mostraram frequência grande de células transformadas (Tabela II). Os dados obtidos com *X. campestris* destacam-se quando se leva em consideração que transformação é processo de recombinação assexual de baixa frequência. A percentagem típica para marcadores únicos em *Bacillus subtilis* é de 0,1 a 0,5%, em níveis saturados de DNA. Na transformação de pneumococos e *Hemophilus* tem sido possível obter condições, nas quais a maioria das células da população expostas ao DNA serem competentes (FOX e HOTCHKISS, 1957; GOODGAL e HERRIOT, 1961) mas, apesar disso, a frequência de transformações únicas não excede a 5% sob essas condições ótimas, e na presença de excesso de DNA. Assim é que SPENCER e HERRIOR (1965), ensaiando o desenvolvimento da competência em *H. influenzae* com vários meios de cultura diferentes, obtiveram percentagem de transformação que variou de  $10^{-6}$  a 5,7%. Em *Neisseria gonorrhoeae*, SPARTING (1966) obteve frequências que oscilaram de  $6 \times 10^{-7}$  a 1%.

TABELA II — Transformação genética bacteriana transferindo resistência à estreptomicina e à eritromicina numa população sensível de *Xanthomonas campestris*.

Células receptoras *	Caráter resistência à estreptomicina.		Caráter resistência à eritromicina.		Caráter duplo, resistência à estreptomicina e à eritromicina	
	T/E x 10 <sup>5</sup> **	Percentagem de células transformadas	T/E x 10 <sup>5</sup> **	Percentagem de células transformadas	T/E x 10 <sup>5</sup> **	Percentagem de células transformadas
1,7 x 10 <sup>8</sup>	2,0 x 10 <sup>3</sup>	2	7,5 x 10 <sup>-2</sup>	0,75	0	0
1,3 x 10 <sup>8</sup>	4,6 x 10	4,6 x 10 <sup>-2</sup>	9,7 x 10 <sup>2</sup>	12,6	3,8	3,8 x 10 <sup>-3</sup>
6,3 x 10 <sup>8</sup>	2,2 x 10	2,3 x 10 <sup>-2</sup>	2,5 x 10	2,5 x 10 <sup>-2</sup>	1,6	1,6 x 10 <sup>-3</sup>

\* População bacteriana semeada em 15 placas contendo agar adicionado de 500 µg/ml de estreptomicina e em placas contendo 500 µg/ml de eritromicina.

\*\* Relação de células transformadas sobre células receptoras.

Assim, *Xanthomonas campestris* mostrou ser suscetível de sofrer transformação genética bacteriana, quando ácido desoxiribonucleico extraído de uma linhagem resistente à estreptomicina e à eritromicina, transferiu os dois marcos genéticos para uma linhagem sensível aos antibióticos.

O ponto máximo de competência celular, em relação ao crescimento bacteriano, para receber ácido desoxiribonucleico, mostrou estar localizado na "lag-phase" e início da fase logarítmica de crescimento.

Bactérias competentes estocadas em caldo glicosado glicerinado a 10%, no refrigerador a 5°C, quando têm o seu caldo substituído por caldo glicosado novo e deixado iniciar a reprodução por 3 a 6 horas, efetuou transformações mais freqüentes.

A freqüência de transformação para a resistência à estreptomicina variou de  $2,2 \times 10^{-2}$  a 2%; para a resistência à eritromicina, de  $2,5 \times 10^{-2}$  a 12% e para duplos transformantes, de  $1,6 \times 10^{-3}$  a  $3,8 \times 10^{-3}$ .

As transformações duplas ocorridas foram devido a dois eventos independentes mas quase simultâneos, não havendo ligação parentesco entre eles.

#### SUMMARY

Evidence of transformation in *Xanthomonas campestris* was found established due to the fact DNA from streptomycin and erythromycin strains was able to transfer two genetic markers to sensitive a recipient strain. The cell competence, as established by the growth curve. Was located toward the end of the lag phase, but early in the exponential phase; the transformation rate of the streptomycin mark was about  $2,2 \times 10^{-2}$  and 2%; for the erythromycin, it was about  $2,5 \times 10^{-2}$  and 12,6%. For double transformants the figures were  $1,6 \times 10^{-3}$  and  $3,8 \times 10^{-3}$ . No linkage was found between markers on the same molecule of DNA.

#### AGRADECIMENTOS

Estamos em débito com o Prof. Metry Bacila pelas críticas e sugestões relacionadas com os dados aqui apresentados. Agradecemos, também, a colaboração técnica da bolsista Dra. Ercilia T. Pires e a do estagiário Juarez Braz Faria, da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALEXANDER, H. E. & LEIDY, G. — 1950 — Transformation type specificity of *Hemophilus*. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, New York, 73:485.

2. ALEXANDER, H. E. & REDMAN, W. J. — 1953 — Transformation type specificity of meningococci. *J. exp. Med.*, 97:797.
3. ALEXANDER, H. E. & LEIDY, G. — 1953 — Induction of streptomycin resistance in sensitive *Hemophilus influenzae* extracts containing deoxyribonucleic acid from resistant *Hemophilus influenzae*. *J. exp. Med.*, 97:17-31.
4. ALEXANDER, H. E.; LEIDY, G. & HAHN, E. — 1954 — Studies on the nature of *Hemophilus influenzae* cells susceptible to heritable changes by deoxyribonucleic acid. *J. exp. Med.*, 99:505-533.
5. ANAGNOSTOPOULOS, C. & SPIZIZEN, J. — 1961 — Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J. Bact.*, 81:741-746.
6. AUSTRIAN, R. — 1952 — Bacterial transformations. *Bact. Rev.*, 16:491-550.
7. AZEVEDO, J. L. — 1961 — Resistência e mutação de *Xanthomonas campestris* (Pammel), Dowson, em relação a alguns antibióticos. Tese de doutoramento apresentada à E.S.A. "Luiz de Queiroz", Piracicaba.
8. BRAUN, W. — 1965 — Genetic transfers II: transformation. In *Bacterial Genetics*. 2.<sup>a</sup> ed. Philadelphia, W. B. Saunders, p. 239.
9. BREED, R. S.; MURRAY, E. G. D. & SMITH, N. R. — 1957 — *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 7.<sup>a</sup> ed. Baltimores, Williams & Wilkins.
10. BRYAN, E. — 1961 — Genetic modifiers of streptomycin resistance in pneumococcus. *J. Bact.*, 82:461-470.
11. CATLIN, B. W. — 1960 — Transformation of *Neisseria meningitidis* by deoxyribonucleates from cells and from culture slime. *J. Bact.*, 79:579-590.
12. COREY, R. R. & STARR, M. P. — 1957<sup>a</sup> — Colony types of *Xanthomonas phaseoli*. *J. Bact.*, 74:137-140.
13. COREY, R. R. & STARR, M. P. — 1957<sup>b</sup> — Genetic transformation of Streptomycin resistance in *Xanthomonas phaseoli*. *J. Bact.*, 74:146-150.
14. DAVIDSON, J. N. — 1965 — *The biochemistry of nucleic acids*. 5<sup>th</sup> ed. London, Methuen, p. 316-322.
15. DAWSON, M. H. & WARBASSE, A. — 1931 — Further observations on transformation of type specific pneumococci by in vitro procedures. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, New York, 29:149.
16. DEMEREC, M. — 1945 — Production of *Staphylococcus* strains resistant to various concentrations to penicillin. *Proc. nat. Acad. Sci.*, Washington, 31:16-24.
17. DEMEREC, M. — 1948 — Origin of bacterial resistance to antibiotics. *J. Bact.*, 56:63-74.
18. EPHRUSSI-TAYLOR, H. E. — 1955 — Current status of bacterial transformations. *Advanc. Virus Res.*, 3:275-279.

19. EPHRUSSI-TAYLOR, H. E. — 1960 — Recombination analysis in microbial systems. In growth: Molecule, Cell, Organism. New York, Basic Book.
20. EPHRUSSI-TAYLOR, H. E. — 1960<sup>b</sup> — On the biological function of deoxyribonucleic acid. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, 10:132-138.
21. FOX, M. S. & HOTCHKISS, R. D. — 1963 — Initiation of bacterial transformation. *Nature*, Londres, 179:1322-1325.
22. GOODGAL, S. & HERRIOT, R. M. — 1961 — Studies on transformations of *Hemophilus influenzae*. I. Competence. *J. gen. Physiol.*, 44: 1201-1227.
23. GRIFFITH, F. — 1928 — Significance of pneumococcal types. *J. Hyg.*, Londres, 27:113.
24. HOTCHKISS, R. D. — 1954 — Cyclical behavior in pneumococcal growth and transformability occasioned by environmental changes. *Proc. nat. Acad. Sci.*, Washington, 40:49-55.
25. HOTCHKISS, R. D. — 1955 — The biological role of the deoxypentose nucleic acids. In Nucleic acids. New York, Academic Press, v. 2, p. 435.
26. HOTCHKISS, R. D. — 1957 — In Methods in Enzymology. New York, Academic Press, v. 3, p. 708.
27. LAMANNA, C. & MALLETTE, M. F. — 1953 — Basic bacteriology. Baltimore, Williams & Wilkins.
28. LEDERBERG, J. & LEDERBERG, E. M. — 1952 — Replica plating, and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bact.* 63:399-341.
29. MARMUR, J. — 1961 — A produce for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J. molec. Biol.* 3:208-218.
30. MASON, M. M. — 1935 — A comparison of maximal growth rates of various bacteria under optimal conditions. *J. Bact.*, 29:103-110.
31. MacCARTY, M.; TAYLOR, H. E.; AVERY, O. T. — 1946 — Biochemical studies of environmental factors essential in transformation of pneumococcal types. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 11:177-183.
32. RAVIN, A. W. — 1961 — The genetic transformations. *Advanc. in Genet.* 10:61-163.
33. RAVIN, A. W. & MISHRA, A. K. — 1965 — Relatives frequencies of different kinds of spontaneous and induced mutants of pneumococci and streptococci capable of growth in presence of streptomycin. *J. Bact.* 90:1161-1173.
34. SHAEFFER, P. — 1956 — Analyse génétique de la résistance à la streptomycine chez le pneumocoque. *Ann. Inst. Pasteur*, 91:323-337.
35. SHAEFFER, P. — 1964 — Transformation in the bacteria. New York, Academic Press, p. 87.

36. SLADE, H. D. & PERRY, D. — 1960 — Transformation reactions among streptococci. *Proc. Am. Heart Assoc.* 21:813.
37. SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS — 1957 — Manual of microbiological methods. New York, McGraw-Hill Books.
38. SPARTING, P. F. — 1966 — Genetic transformation of *Neisseria gonorrhoeae* to streptomycin resistance. *J. Bact.* 92:1364-1371.
39. SPENCER, H. T. & HERRIOT, R. M. — 1965 — Development of competence of *Hemophilus influenzae*. *J. Bact.* 90:911-920.
40. SPIZIZEN, J. — 1958 — Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *J. Bact.*, 92:1364.
41. SPIZIZEN, J.; REILLY, B. E. & EVANS, H. H. — 1966 — Microbial transformation and transfection. *Ann. Rev. Microbiol.* 20:371-396.
42. STARR, M. P. — 1946 — The nutrition of phytopathogenic bacteria. I. Minimal nutritive requirements of genus *Xanthomonas*. *J. Bact.*, 51: 131-143.
43. STUDY, J. H. — 1962 — Transformability of *Hemophilus influenzae*. *J. gen. Microbiol.*, 29:537-549.
44. THOMAS, R. — 1962 — Recherches sur la structure et les fonctions des acides désoxyribonucleiques: études génétiques et chimiques. Paris, Masson (Actualités Biochimiques, 21).
45. YOUNG, F. E. & SPIZIZEN, — 1961 — Physiological and genetic factors affecting transformation of *Bacillus subtilis*. *J. Bact.* 81:823-829.
46. WATSON, J. D. — 1965 — Molecular biology of the gene. New York, W. A. Benjamin, p. 77.
47. ZAMENHOF, S. — 1952 — Purification and analysis of the transforming principle of *Hemophilus influenzae*. *Bull. N. Y. Acad. Sci.* 28:349-350.