

BROTÉRIA GENÉTICA

REVISTA QUADRIMESTRAL

ÓRGÃO DA SOCIEDADE PORTUGUESA DE GENÉTICA

Subsidiada pelo
Instituto Nacional de Investigação Científica

NÚMERO 2-3

VOLUME VI (LXXXI)

1985

REVISTA "BROTÉRIA"
BIBLIOTECA



ÓRGÃO DA SOCIEDADE PORTUGUESA DE GENÉTICA

CONSELHO DE REDACÇÃO:

Prof. Dr. Luís J. Archer (Director e Proprietário)
Cristina Marinho (Secretária)
Prof. Dr. Jorge Antunes-Correia
Prof. Dr. Miguel Pereira Coutinho
Eng.º Tristão Mello-Sampayo
Prof. Dr. Luís Sieuve Monteiro
Prof. Dr. Amândio S. Tavares

ADMINISTRADOR: Januário Geraldes

CONDIÇÕES DE ASSINATURA PARA 1986

Portugal: Esc.: 600\$00 (oferecida gratuitamente pelo Sociedade Portuguesa de Genética aos seus sócios)
Espanha e Países de expressão portuguesa, Dol. \$7.00
Outros Países: Dol. \$14.00
Número avulso: Esc. 250\$00

REDACÇÃO E ADMINISTRAÇÃO:

BROTÉRIA GENÉTICA
R. Maestro António Taborda, 14
1293 LISBOA CODEX
Telef. 66 16 60

Composto e Impresso nas oficinas gráficas da Editorial Império, Lda.
Rua do Salitre, 155, 1.º—Telef. 57 31 73—1296 Lisboa Codex—Portugal

ÍNDICE

TEMAS EM FOCO

- Reprodução humana artificial 93
por *Luis J. Archer*
- Terapia génica no homem 97
por *Luis J. Archer*

ARTIGOS GERAIS DE REVISÃO

- Seres celulares: classificação genética e fontes de energia 99
por *A. Madeira Lopes*
- O mecanismo da transdução generalizada 121
por *Hermínia de Lencastre*

ARTIGOS DE INVESTIGAÇÃO

- Sur la caryologie de *Lavandula Latifolia Medicus*
- I—Les Plantes du Portugal 161
por *A. Fernandes e M. Teresa Leitão*
- Relatedness of Bacteriophages PBS1, AR9, 3NT and I10 of *Bacillus subtilis* 179
por *Graça A. Vieira, Hermínia de Lencastre and Luis J. Archer*

NOTAS E NOTÍCIAS

- 5th Congress of the European Anthropological Association 191



111

NOTAS DE LA COMISION

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

REPRODUÇÃO HUMANA ARTIFICIAL

Luís J. Archer

Dentro de alguns meses nascerá em Lisboa o primeiro português que não foi concebido em ventre de mulher nem provém dum acto sexual. Resulta dum acto científico-tecnológico: a fusão, no laboratório, dum óvulo com um espermatozóide, ambos extraídos dum casal da Musgueira que queria muito ter um filho, e doutro modo não o poderia ter. O óvulo fertilizado foi, como sempre nestes casos, transferido posteriormente para o útero da mulher, e desencadeou uma gravidez normal.

Quando se tiver acesso ao conhecimento de toda a história humana subjacente ao caso, então se compreenderá, na alegria irradiante daquele casal, que a tecnologia não fez mais que possibilitar às células sexuais daquele homem e daquela mulher a união feliz e fecunda que corporiza o encontro das suas vidas em amor. Poucas crianças terão sido tão custosa e longamente desejadas. Poucas serão tão pensadamente filhas do amor matrimonial.

Este caso, como milhares de outros pelo mundo fora, mostram como as novas técnicas podem ser humanizadoras. E este facto não deve ser ocultado, nem mesmo por causa das situações, que também existem, em que as mesmas técnicas podem conduzir à mecanização da procriação e à desumanização da vida: a construção de seres humanos com células sexuais daqueles que não se amam nem se conhecem. São os casos conhecidos de «mães hospedeiras» («úteros de aluguer»), doação de óvulos e espermatozóides, etc.

Com todo este conjunto de situações se preocupam, pelo mundo fora, as comissões nacionais que estudam os problemas éticos e jurídicos relacionados com a reprodução humana artificial.

Apresentei um resumo das principais posições dessas comissões no número de Novembro-Dezembro do ano passado da Revista «Communio» (vol. I, n.º6, p. 533-550). Posteriormente, porém, já houve muita experiência ganha e muita reflexão aprofundada. Darei aqui apenas uma ideia geral das principais reorientações recentes.

Há unanimidade, entre as Comissões que já se pronunciaram, acerca da liceidade da utilização da fertilização *in vitro* (IVF ou «bebé-proveta») dentro do casal (isto é, com os gametas do marido e da mulher) quando se verifica ser para eles o único método possível para terem filhos. Mas mesmo nesses casos, várias Comissões (e dum modo particularmente explícito as da Suécia e da Holanda) chamam a atenção para as tensões psicológicas que normalmente se desenvolvem nos casais que

tentam IVF, e põem em relevo a necessidade duma decisão médica ponderada e dum aconselhamento e acompanhamento psicológico competentes.

Quanto a todas as outras situações (em que um ou ambos os gâmetas e/ou o útero não são fornecidos pelo casal) nota-se uma certa tendência a encontrar-se-lhes cada vez mais objecções. No seu recente Relatório, a Comissão Nacional Sueca condena todos esses casos. Afirma que ter filhos não é um direito humano incondicionado, e que as deficiências naturais têm simplesmente de ser aceites, quando um aparente suprimento da infertilidade contraria completamente o processo natural da vida. Sublinha, além disso, os riscos para a sã personalidade dos pais e filhos.

O estudo, apenas iniciado, do equilíbrio psicológico e da consciência de identidade dos jovens originados por processos de reprodução artificial heteróloga, trará novos e importantes elementos de apreciação ética. Na Suécia, recente legislação reconhece o direito a todos os maiores de 18 anos de serem informados acerca da identidade dos dadores de gâmetas que estiveram na origem da sua existência. Em consequência disso, faltam agora dadores voluntários para bancos de esperma, e diminuem as possibilidades de inseminação artificial e IVF heterólogas.

Que a transferência dum blastocisto para o útero seja autorizada só no caso de mulheres casadas (ou correspondente) começa a ser urgido por cada vez mais Comissões. Além da França e da Suíça, já se pronunciaram nesse sentido a Suécia e a Noruega.

Nova legislação nos Estados de New South Wales e Victoria (Austrália) estabelece a mesma restrição, além de, abolindo legislação anterior, definir como mãe e detentora do direito à criança, toda a mulher que tenha dado à luz, independentemente de ser sua ou não a proveniência do óvulo. Esta legislação implica que é considerado irrito qualquer contrato de mães hospedeiras, prática que a Comissão Nacional da França entretanto defendeu como ilegal e punível pela legislação francesa actual, que, em sua opinião, não deve ser alterada.

Na Suíça, as normas em elaboração na Academia das Ciências Médicas (e que referi no artigo acima indicado) passaram entretanto a ter uma versão um pouco mais restritiva: a IVF é considerada como primariamente destinada a utilizar os gâmetas do casal, e só excepcionalmente admite casos em que um deles (nunca ambos) provenha dum dador exterior.

Na Holanda, a «Committee of the Council for Public Health», depois de considerar a magnitude e dificuldade dos problemas éticos envolvidos, recomenda o estabelecimento dum número muito limitado de Centros de IVF em que, duma forma controlada e equilibrada, os problemas possam ser identificados logo que surjam, e evitados a tempo.

A Comissão francesa põe em relevo as limitações que condicionam o direito a ter filhos, e os perigos de que estes sejam subtilmente instrumentalizados pelos pais. Nesta perspectiva, e na da defesa integral dos direitos da criança, a Comissão propõe e lança as bases para um debate amplo e profundo a nível nacional, de modo a que todos os sectores da opinião pública sejam correcta e completamente informados, e então possam pronunciar-se.

Para a harmonização destas várias evoluções em diferentes países, no contexto da preocupação geral duma unificação da mentalidade europeia, o Conselho da

Europa tem tido em funcionamento regular, desde 1983, uma «Ad hoc Committee of experts on ethical and legal problems relating to human genetics», em que tenho participado como delegado português. Em Junho passado, porém, o Comité de Ministros do Conselho da Europa, considerando as vastas implicações deste tema noutras áreas, decidiu que esta Comissão continue o seu trabalho sob a forma duma outra Comissão com objectivos mais amplos e designada «Ad hoc Committee of experts on progress in the biomedical sciences», que inclua também os problemas relacionados com os direitos humanos, e superintenda sobre os materiais produzidos por uma outra Comissão que estude os problemas legais resultantes dos progressos da medicina. Esta nova Comissão, a que também pertenço como delegado português, acaba de ter a sua primeira reunião (Estrasburgo, 19-22 de Novembro).

O seu trabalho deverá estar terminado em 31 de Dezembro de 1986.

TERAPIA GÊNICA NO HOMEM

Luis J. Archer

É bem sabido como as técnicas de engenharia genética, que permitem transferir genes com precisão e meticulosidade de um organismo para outro, em breve serão aplicadas ao homem, com objectivo terapêutico: curar algumas doenças hereditárias na sua própria raiz — o DNA.

Numa nota anterior (Brotéria-genética, IV: 5-6; 1983) distingui a terapia génica em células somáticas daquela que se planeia realizar, mais tarde, em células da linha germinal masculina.

No primeiro caso, trata-se por exemplo de extrair células da medula óssea dum paciente afectado por uma doença de sangue hereditária, transformar *in vitro* essas células fornecendo-lhes o DNA correcto que lhes falta e que algumas delas incorporarão, e finalmente reintroduzir, na medula óssea do paciente, as células recém-transformadas.

Esta terapia deverá eliminar a enfermidade de sangue do paciente, mas não afectará as suas células sexuais. Ele continuará, portanto, a poder transmitir a sua anterior doença com a mesma probabilidade de antes. Para evitar esta transmissão, será necessária uma outra terapia que atinja as células da linha germinal, cujos estudos preparatórios já vão adiantados, mas só será praticável daqui a uns 5 a 10 anos.

A terapia em células somáticas, pelo contrário, está em condições de ser executada muito em breve (o que está de acordo com as previsões do citado artigo dos inícios de 1983).

Para exemplificar a segurança, pormenor e meticulosidade com que estes estudos avançam, vou referir os elementos que estão na base das normas que acabam de ser publicadas pelos National Institutes of Health (NIH) no Federal Register (vol. 50, p. 33461-33467; 19/8/85).

A aceitabilidade da terapia génica no homem foi objecto de inúmeros estudos e publicações. Baseada neles e num debate público de cerca de 2 anos, a «Commission for the Study of Ethical Problems in Medicine and Biomedical and Behavioural Research» publicou em Novembro de 1982 um Relatório intitulado «Splicing Life». Depois de algum tempo, uma subcomissão da Câmara dos Representantes americana organizou 3 dias de amplas audiências públicas com especialistas das ciências biomédicas e sociais, assim como com filósofos, teólogos e juristas.

Os textos e conclusões destas discussões foram publicados («Human Gene Therapy», Office of Technology Assessment, Dezembro de 1984) e terminam com esta frase: «Civic, religious, scientific, and medical groups have all accepted, in principle, the appropriateness of gene therapy of somatic cells in humans for specific genetic diseases. Somatic cell gene therapy is seen as an extension of present methods of therapy that might be preferable to other technologies».

No mês seguinte, o «Working Group on Human Gene Therapy» publicou para discussão uma primeira versão duma lista de pormenores considerados importantes para a eventual aprovação dum protocolo concreto de terapia génica de células somáticas (Federal Register, 50: 2940; 22/1/85).

Em resultado de 15 cartas de comentário que foram recebidas, o Working Group reelaborou essa lista e publicou a nova versão em Agosto passado (citado acima), que está de novo em fase de discussão pública e a caminho da formulação definitiva.

Isto significa que a primeira experiência de terapia génica num ser humano só se poderá realizar quando o seu protocolo, pormenorizado de acordo com a mencionada lista de perguntas, for aceite pela Recombinant DNA Advisory Committee (RAC), aprovado pelo NIH (aprovação sempre caso a caso) e publicado em resumo para comentários públicos.

A referida lista é longa e pormenorizada. Exige a descrição de todos os detalhes técnicos incluindo, por exemplo, os testes que asseguram a pureza, homogeneidade e não contaminação do DNA usado para transformar as células humanas, evidência experimental da inexistência de efeitos secundários como viroses, mutações deletérias ou neoplasias (experiências em animais), provas de que essas técnicas não vão afectar células da linha germinal nem pessoas em contacto com o paciente, etc.

A lista refere-se ainda a problemas relacionados com a selecção justa dos pacientes, tipo de consentimento requerido por parte do doente, limites e garantia de confidencialidade, formas de comunicação da informação ao público, prevenindo casos em que possa estar implicado um requerimento de patente, etc.

Apesar da dramaticidade das experiências (trata-se nada menos que de alterar o DNA dum homem) esta metodologia de informação e consulta do público parece não deixar possibilidade para que se levante, de novo, o pânico do grande público. Tanto foi o que se aprendeu da terrível agitação social que, por menos, explodiu em 1977!

SERES CELULARES: CLASSIFICAÇÃO GENÉTICA E FONTES DE ENERGIA

A. Madeira-Lopes

Laboratório de Microbiologia, Instituto Gulbenkian de Ciência, Apartado 14, 2781 Oeiras Codex

ABSTRACT

Observations mainly on ribosome projections and on nucleotide sequences of 16 S and 18 S rRNA allowed the distinction of five primary kingdoms: eubacteria, archaeobacteria, eocytes, thermoplasmae and eukaryotes. Though the elemental composition of organisms is apparently very similar, their nutritional as well as energy sources can be quite variable. Carbon requirements are either organic or inorganic. Energy is generated either by substrate-level phosphorylation, during fermentation processes, or by membrane-bound phosphorylation, following respiration or photosynthetic processes. In fermentation, electron donors as well as electron acceptors are organic compounds. In respiration, electron donors can be organic or inorganic and electron acceptors are either molecular oxygen (aerobic respiration) or alternative oxidants (anaerobic respiration). Three photosynthetic processes have been recognized: chlorophyll-dependent, bacteriochlorophyll-dependent and bacteriorhodopsin-dependent.

Classificação dos organismos

Uma parte da actividade metabólica dos organismos vivos consome energia química sob a forma dum composto altamente reactivo, o ATP, que eles próprios sintetizam. É peloouro desta revisão exemplificar processos, donde deriva a energia ultimamente captada na síntese de ATP, e organismos que utilizam esses processos.

Para já, entendamo-nos quanto aos organismos e, com esse objectivo em vista, estanquemos a dinâmica dos conceitos classificativos, muito mexida por observações dos últimos anos (MADEIRA-LOPES 1981, 1982a, 1984b, 1985b) e fiquemos por uma classificação recentemente proposta com base em resultados da área da genética molecular (Quadro 1). Pondo de lado os «seres» subcelulares (vírus, viróides, plasmídeos e príões), que estão à margem da presente discussão, distinguem-se cinco grupos primários de seres celulares: eubactérias, arqueobactérias, eócitos, termoplasmas e eucariontes. Os fundamentos para a definição destes grupos primários (super-reinos) provieram, essencialmente, de análise comparada de sequências nucleotídicas do rRNA 16 S e 18 S (FOX *et al.* 1980, STACKEBRANDT and WOESE 1984), da microscopia electrónica de projecções das subunidades dos ribos-

QUADRO 1
Classificação dos seres celulares

Super-reino	Reino	Exemplos de gêneros
1. EUBACTÉRIAS	1.1. Eubactérias Gram positivas, <i>Mollicutes</i>	<i>Bacillus</i> <i>Mycoplasma</i>
	1.2. Cianobactérias	<i>Anabaena</i> (CLOROPLASTOS)
	1.3. Cromatiáceas, Rodospiriláceas, outras Gram negativas	<i>Chromatium</i> <i>Rhodospirillum</i> <i>Escherichia</i> (MITOCÔNDRIAS)
	1.4. Redutoras de enxofre	<i>Desulfovibrio</i>
	1.5. Cloroflexáceas	<i>Chloroflexus</i>
	1.6. Clorobiáceas (mais 4 reinos)	<i>Chlorobium</i>
2. ARQUEBACTÉRIAS	2.1. Metanogénicas	<i>Methanosarcina</i>
	2.2. Halófilas	<i>Halobacterium</i>
3. EÓCITOS	3.1. <i>Sulfolobales</i>	<i>Sulfolobus</i>
	3.2. <i>Thermoproteales</i>	<i>Thermoproteus</i>
4. TERMOPLASMAS		<i>Thermoplasma</i>
5. EUCARIONTES	5.1. Protozoários	<i>Tetrahymena</i>
	5.2. Algas	<i>Dunaliella</i>
	5.3. Fungos	<i>Saccharomyces</i>
	5.4. Animais	<i>Homo</i>
	5.5. Plantas	<i>Pinus</i>

somas (HENDERSON *et al.* 1984, LAKE *et al.* 1984), além doutras características da biologia molecular dos organismos (MADEIRA-LOPES 1984b, 1985b). Quanto aos reinos, os eubacterianos e os arquebacterianos são reconhecidos pelos seus rRNA 16 S e por estudos de hibridação DNA-DNA e DNA-rRNA; os eocíticos e os eucarióticos ainda assentam mais em características fenotípicas do que genéticas (ZILLIG *et al.* 1985).

Os exemplos de gêneros e espécies que daremos, no contexto da discussão que se segue, vêm referenciados com a indicação do reino onde cada um se inclui.

No Quadro 1, reinos 1.2 e 1.3 respectivamente, surgem as organelas mitocondrias e cloroplastos, a lembrar a teoria endossimbiótica da origem da célula encariótica: os recipientes sugeridos têm sido *Sulfolobus*, *Halobacterium* e *Thermoplasma*, ou ainda organismos com eles aparentados (WOESE *et al.* 1978, WOESE 1979, VAN VALEN and MAIORAMA 1980, MARGULIS 1981, WOESE and GUPTA 1981, WALLACE 1982, GRAY and DOOLITTLE 1982, MADEIRA-LOPES 1982a, STACKEBRANDT and WOESE 1984, LAKE *et al.* 1984).

Fosforilação

Conhecem-se células que geram ATP pelo mecanismo escalar da fosforilação ao nível do substrato (essencialmente em processos fermentativos), em que é enzi-

maticamente transferido, para o ADP, um grupo fosfato rico em energia pertencente a um composto intermediário numa sequência de reacções de oxidação-redução; os doadores de electrões e os receptores de electrões são ambos compostos orgânicos (ORGANOTROFISMO), e o nível médio de oxidação dos produtos finais é idêntico ao do substrato ou substratos iniciais (STANIER *et al.* 1976, JONES 1982).

Conhecem-se células que geram ATP pelo mecanismo vectorial da *fosforilação associada a membranas*, em que um sistema enzimático complexo, a ATP-sintase, catalisa a ligação de ADP a um fosfato inorgânico livre, utilizando a energia resultante dum translocação de protões; esta translocação torna-se possível pela prévia formação dum gradiente electroquímico através da membrana (teoria de Mitchell) que é, por sua vez estabelecido por uma corrente de protões (em sentido contrário ao da translocação) gerada por uma cadeia de transporte de electrões. As cadeias de transporte de electrões estão associadas a processos respiratórios ou a processos fotossintéticos (SLATER 1976, JONES 1976, 1982, HINKLE and MC CARTY 1978, SHAVIT 1980, CROSS 1981, FERGUSON and SORGATON 1982, AMZEL and PEDERSEN 1983, COBLEY and COX 1983, TANFORD 1983, INGLEDEN and POOLE 1984). Os doadores de electrões da respiração podem ser compostos orgânicos (ORGANOTROFISMO) ou inorgânicos (LITOTROFISMO), tratando-se em ambos os casos de QUIMIOTROFISMO, por oposição à fotossíntese (FOTOTROFISMO).

E conhecem-se células capazes de gerar ATP pelos dois mecanismos fosforilativos em dois ou mesmo em três tipos de processos energéticos — fermentação, respiração e fotossíntese (MIXOTROFISMO).

Necessidades energéticas

As células utilizam energia na biossíntese das suas moléculas, na manutenção da sua integridade (degradação e ressíntese de macromoléculas), no transporte de solutos através das membranas, na produção de movimento e de calor.

Vários factores, como temperatura, pH, concentração de oxigénio, presença de iões metálicos, de aminoácidos, de vitaminas, de bases púricas e pirimídicas, afectam o coeficiente de rendimento, isto é, a razão entre a biomassa formada e a quantidade de nutriente consumida (PAYNE and WIEBE 1978). Geralmente, quanto mais complexo é o meio, melhor é o crescimento dos organismos, havendo organismos com necessidades específicas em termos de aminoácidos ou de bases (AUXOTROFISMO) em relação a outros organismos que os conseguem sintetizar (PROTROTROFISMO).

A quantidade de energia que o organismo tem à sua disposição é determinante, dentro de certos limites, da sua temperatura máxima de crescimento (VAN UDEN and MADEIRA-LOPES 1975), uma vez que a reparação dos danos causados pelo calor conduzem a um aumento da energia da manutenção (VAN UDEN and MADEIRA-LOPES 1976). A ausência de fonte de energia, assim como a incapacidade de utilização da fonte de energia devido à presença dum enzima termossensível

vel, aumentam a taxa específica de morte em populações de leveduras (MADEIRA-LOPES 1982b). Quando a fonte de energia funciona também como fonte de carbono, como acontece em muitos casos de heterotrofismo, o rendimento, em termos de biomassa produzida, é uma função da temperatura e varia com a espécie em estudo (SPENCER-MARTINS and VAN UDEN 1982, LEMOS-CAROLINO *et al.* 1982, MADEIRA-LOPES and VAN UDEN 1982, CABEÇA-SILVA and MADEIRA-LOPES 1984, MADEIRA-LOPES and CABEÇA-SILVA 1984, MADEIRA-LOPES 1985a, MADEIRA-LOPES *et al.*, 1986).

LURIA (1960) compilou observações sobre a composição elementar de células de *Escherichia coli* (1.3). Supõe-se que, na generalidade das células doutros organismos, a composição é essencialmente semelhante, embora haja organismos em que um elemento possa estar em maiores proporções (ex. S, Fe, Ca). Havendo 80% a 90% de água nas células, os restantes 20% a 10% têm a seguinte composição aproximada: carbono, 50%; oxigénio, 20%; azoto, 14%; hidrogénio, 8%; fósforo, 3%; enxofre, 1%; sódio, 1%; potássio, 1%; cálcio, 0,5%; magnésio, 0,5%; cloro, 0,5%; ferro, 0,2%; todos os outros, 0,3%. Os elementos são captados de nutrientes apropriados: os metálicos, a partir de sais inorgânicos, e os não-metálicos, a partir de nutrientes específicos, mais ou menos complexos conforme os organismos.

Em trabalhos realizados com *Streptococcus faecalis* (1.1), *Zymomonas mobilis* (1.3) e *Saccharomyces cerevisiae* (5.3), encontrou-se que uma molécula-grama de ATP (6×10^{23} moléculas) dá para construir 10,5 gramas de peso seco, ou seja cerca de 100 gramas de biomassa (ROSE 1976). Assim, a síntese numa célula dum bactéria, com um milionésimo de micrograma (1×10^{-6} μg), necessita de cinco mil milhões (5×10^9) de moléculas de ATP. A adição de cada monómero a um ácido nucleico gasta 2 moléculas de ATP; a uma proteína, 5; a um lípido, 7; e a um polissacárido, 2.

Fontes de carbono

As necessidades em carbono dos organismos são essencialmente satisfeitas quer com compostos inorgânicos (CO_2): AUTOTROFISMO, ou com compostos orgânicos: HETEROTROFISMO, havendo organismos capazes dos dois mecanismos. A fixação de dióxido de carbono requer energia e poder redutor e é conseguida por uma de três sequências. O ciclo de Calvin (Fig. 1) tem como enzima-chave a bisfosfato-carboxilase-oxigenase, ou carboxidismutase (MIZIORKO and LORIMER 1983, DIJKUIZEN and HARDER 1984) e é utilizado pelas plantas (5.5), algas (5.2), cianobactérias (1.2), cromatiáceas (1.3), rodospiriláceas (1.3), bactérias nitrificantes (1.3), eubactérias oxidantes de enxofre (1.3) e eubactérias metilotróficas autotróficas (1.3). O ciclo de Kerbs invertido (Fig. 2) envolve duas carboxilações dependentes e duas independentes de ferredoxina (ORMEROD 1983) e é usado pelas cloroflexáceas (1.5) e clorobiáceas (1.6). Uma outra sequência (Fig. 3), encontrada em arqueobactérias metanogénicas (2.1), envolve as enzimas fosfoenolpiruvato-carboxilase, piruvato-sintase e oxoglutarato-sintase (LARGE 1983). É ainda desconhecido o mecanismo de fixação de dióxido de carbono dos eócitos (3) (FISCHER *et al.* 1983, SEGERER *et al.* 1985, ZILLIG *et al.* 1985).

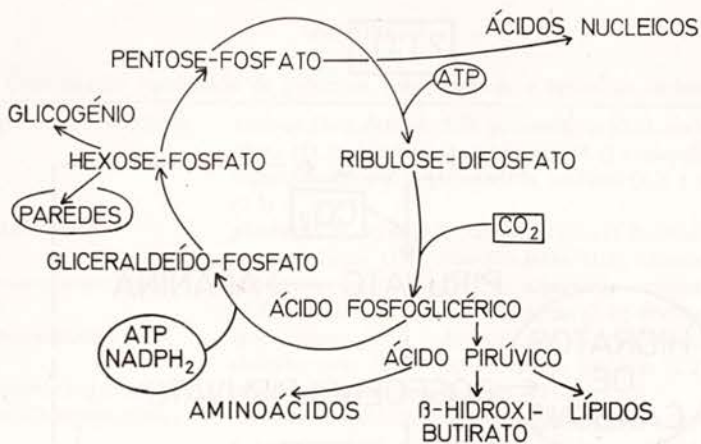


Fig. 1—Ciclo de Calvin

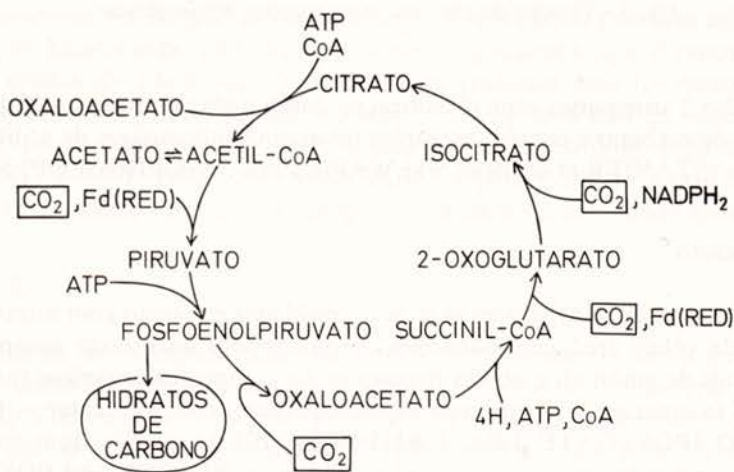


Fig. 2—Ciclo de Krebs invertido

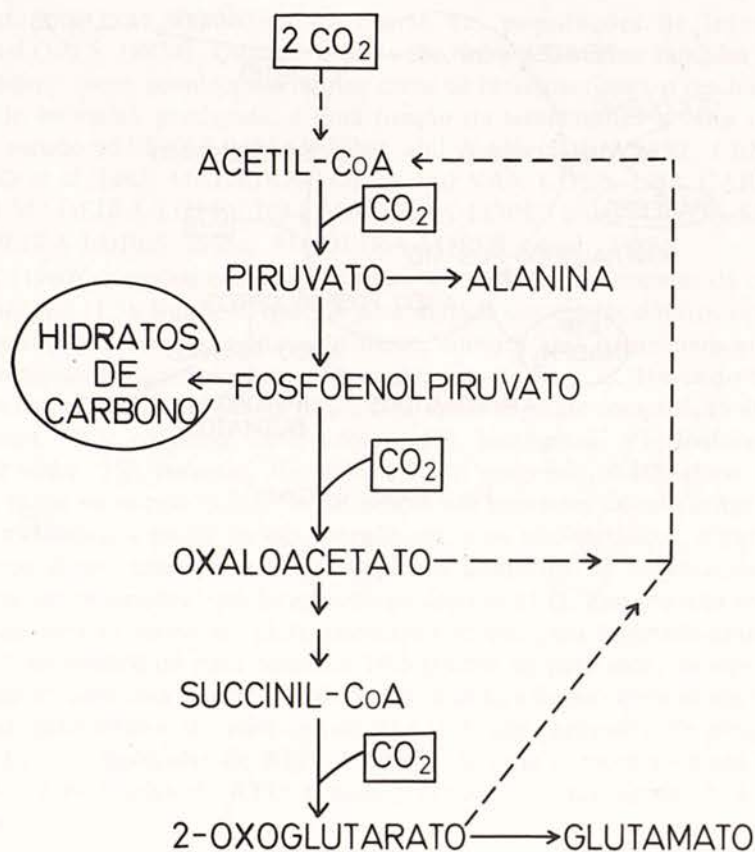


Fig. 3 — Fixação de CO_2 em arqueobactérias metanogênicas

O Quadro 2 sistematiza uma classificação combinada de processos bioenergéticos e fontes de carbono e contém exemplos de organismos capazes de utilizar essas combinações (STANIER *et al.* 1976, STEWART 1983, MADEIRA-LOPES 1984a).

Fontes de azoto

Muitos organismos satisfazem as suas necessidades em azoto com nitrato, que é reduzido pela célula (redução assimilativa); outros têm de utilizar compostos já reduzidos (sais de amônio), e alguns necessitam de compostos orgânicos (aminoácidos, etc.). E existem ainda organismos capazes de fixar azoto molecular — DIAZOTROFISMO (POSTGATE 1978, CAMPBELL 1983), através dum complexo enzimático, a nitrogenase, muito sensível ao oxigénio (ROBSON and POSTGATE 1980) e a altas concentrações de ATP; uma molécula de ATP é no entanto necessário para a transformação $\text{N}_2 \rightarrow \text{NH}_3$.

QUADRO 2

Classificação combinada de processos bioenergéticos e fontes de carbono

1. Organoquímio-heterotrofismo:	animais (5.4), fungos (5.3), protozoários (5.1), maioria de eubactérias (1) incluindo rodospiriláceas (1.3) e cloroflexáceas (1.5), termoplasmas (4), arqueobactérias halófilas (2.2) e metanogénicas (2.1)
2. Foto-autotrofismo:	plantas (5.5), algas (5.2), cianobactérias (1.2), cromatiáceas (1.3), rodospiriláceas (1.3), cloroflexáceas (1.5), clorobiáceas (1.6)
3. Litoquímio-autotrofismo:	eubactérias nitrificantes (1.3), eubactérias oxidantes de enxofre (1.3), arqueobactérias metanogénicas (2.1), eócitos (3)
4. Foto-heterotrofismo:	cromatiáceas (1.3), rodospiriláceas (1.3), clorobiáceas (1.6), cloroflexáceas (1.5), arqueobactérias halófilas (2.2)
5. Organoquímio-autotrofismo:	eubactérias metilotróficas autotróficas (1.3)
6. Litoquímio-heterotrofismo:	algumas eubactérias sulfato-redutoras (1.4) e nitrificantes (1.3), e arqueobactérias metanogénicas (2.1)

Os organismos fixadores de azoto incluem eubactérias fixadoras, em simbiose com eucariontes: *Rhizobium* (1.3) com leguminosas (5.5); actinomicetas (*Frankia* (1.1)) com *Alnus e Casuarina* (5.5)); e cianobactérias (1.2) com fungos (5.3), com hepáticas (5.5) e com pteridófitos (5.5). Os fixadores livres incluem azotobacteráceas (1.3), inicialmente estudadas por BEIJERINCK (1901), cianobactérias (1.2), cromatiáceas (1.3), rodospiriláceas (1.3), *Clostridium* (1.1), *Desulfovibrio* (1.4), *Desulfotomaculum* (1.4), e ainda arqueobactérias metanogénicas (2.1) (MURRAY and ZINDER 1984, BELAY *et al.* 1984).

Tem interesse referir que as cianobactérias filamentosas possuem células especializadas, os heterocistos, que fixam o azoto em glutamina, que é exportada para as outras células do filamento. Os heterocistos realizam uma fotossíntese cíclica dependente de clorofila em que há produção de ATP mas não de poder redutor; não fixam dióxido de carbono, sendo o carbono orgânico importado das células vizinhas (STEWART 1980, 1983, MADEIRA-LOPES 1984a, GOLDEN *et al.* 1985). Não há, assim, formação de oxigénio, inibidor da actividade nitrogenásica.

Fermentação

Certamente os exemplos mais conhecidos de fermentações são a fermentação alcoólica, conduzida pela levedura *Saccharomyces* (5.3) e pela eubactéria *Zymomonas* (1.3) (ROGERS *et al.* 1984), por exemplo, e a fermentação homoláctica, conduzida por células musculares animais (CORI 1976) e pelas eubactérias lácticas *Streptococcus e Lactobacillus* (1.1). As fontes de energia são açúcares simples e tanto os dadores como os receptores de electrões das reacções de oxidação-redução são compostos gerados por transformações químicas do próprio açúcar.

Outro exemplo de fermentação é a reacção de Stickland que é levada a cabo por espécies do género *Clostridium* (1.1), eubactéria produtora de endósporos e estritamente anaeróbia. Tanto os dadores como os receptores de electrões são aminoácidos (Quadro 3); e dois deles, tirosina e triptofano, podem desempenhar os dois papeis. No caso do par alanina-glicina (Fig. 4) os produtos são ácido acético, amoníaco e dióxido de carbono, mas se intervierem cisteína ou metionina, sulfureto será um dos produtos (putrefacção).

Mas *Clostridium* também fermenta hidratos de carbono, como se pode ver no Quadro 4, que ainda apresenta, em resumo, outros tipos de fermentações (DOELLE 1975).

Respiração

Contrariamente aos processos fermentativos, os processos respiratórios são caracterizados pela presença de cadeias de transporte de electrões localizadas em sistemas membranosos. Na respiração, os dadores de electrões podem ser compostos orgânicos (por exemplo, etanol, glucose, glicerol), iões inorgânicos (por exemplo, amónio, nitrito, sulfureto, tiosulfato, ferro ferroso), ou elementos (por exemplo, hidrogénio, enxofre). Os receptores finais de electrões são o oxigénio, na RESPIRAÇÃO AERÓBIA, ou fumarato, nitrato, sulfato, dióxido de carbono, ferro férrico, enxofre, na RESPIRAÇÃO ANAERÓBIA.

Ilustrativo da variedade de processos energéticos possíveis num só organismo é o caso da eubactéria *Escherichia coli* (1.3). Além de fermentativa (como vimos, ela pode conduzir uma fermentação ácida mista, com formação de ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico, dióxido de carbono e hidrogénio, e em que o ATP é gerado pelo mecanismo escalar da fosforilação ao nível do substrato), *E. coli* tem ainda capacidades respiratórias aeróbias e anaeróbias, em que o ATP é gerado pelo mecanismo vectorial da fosforilação associada a membranas, dependente de cadeias de

QUADRO 3

Aminoácidos intervenientes na reacção de Stickland: t.r.o.=taxa relativa de oxidação; t.r.r.=taxa relativa de redução

dadores de electrões	t.r.o.	receptores de electrões	t.r.r.
alanina	100	glicina	100
leucina	100	prolina	100
isoleucina	100	hidroxiprolina	100
norleucina	100	ornitina	100
valina	76	arginina	80
histidina	37	*triptofano	67
fenilalanina	28	*tirosina	25
*triptofano	17	cisteína	22
*tirosina	16	metionina	15
serina	16		
asparagina	13		

Oxidação de alanina

Redução da glicina

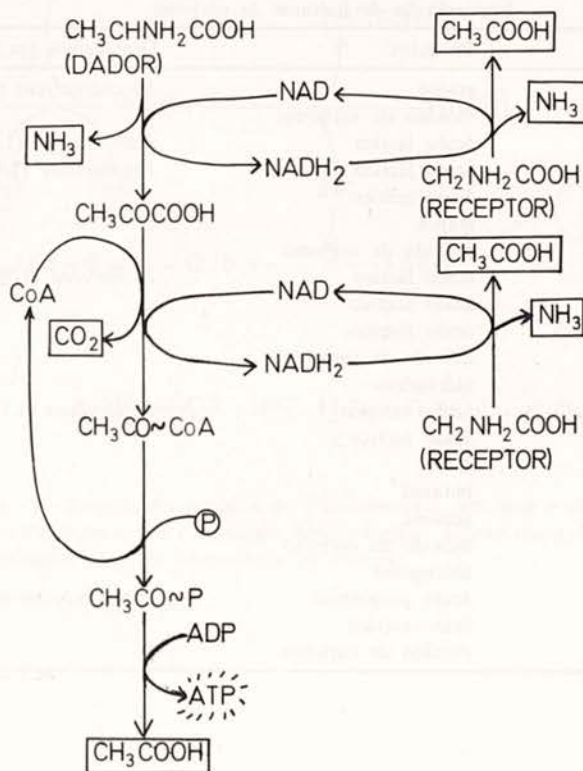


Fig. 4—Exemplo de reacção de Stickland (putrefacção)

transporte de electrões. Quando o receptor de electrões é o oxigénio (respiração aeróbia), o dador pode ser NADH_2 (que recebeu os electrões de vários dadores iniciais, glucose, por exemplo), hidrogénio molecular, formato, lactato, ou α -glicerofosfato: na cadeia de transporte de electrões intervém uma quinona e o citocromo terminal é o citocromo o ou o citocromo d. Com idênticos dadores, mas trocando o receptor final e o citocromo terminal, respectivamente, pelo nitrato e pela enzima nitrato-redutase, o processo passa a ser uma respiração anaeróbia. Outro tipo de respiração anaeróbia é ainda conhecido em *E. coli* em que os dadores podem ser NADH_2 , hidrogénio molecular, α -glicerofosfato, ou formato, e em que o receptor final é o fumarato que passa a succinato, por acção da enzima fumarato-redutase; na cadeia de transporte de electrões intervém uma metaquinona (INGLEDEW and POOLE 1984).

QUADRO 4

Fermentação de hidratos de carbono

Fermentação	Produtos	Organismos (ex.)
alcoólica	etanol dióxido de carbono	<i>Saccharomyces</i> (5.3)
homoláctica	ácido láctico	<i>Lactobacillus</i> (1.1)
heteroláctica	ácido láctico ácido acético etanol dióxido de carbono	<i>Leuconostoc</i> (1.1)
ácida mista	ácido láctico ácido acético ácido fórmico dióxido de carbono	<i>Escherichia</i> (1.3)
butírica	hidrogénio ácido butírico ácido acético etanol butanol acetona dióxido de carbono hidrogénio	<i>Clostridium</i> (1.1)
propiónica	ácido propiónico ácido acético dióxido de carbono	<i>Propionibacterium</i> (1.1)

Nitrificação

As bactérias nitrificantes levam a cabo respirações aeróbias. Como dador de electrões, *Nitrosomonas* utiliza amoníaco (Fig. 5) e *Nitrobacter* utiliza nitrito (Fig. 6): os produtos são, respectivamente, nitrito e nitrato. A energia e o poder redutor obtidos vão em parte entrar no ciclo de Calvin onde é fixado o dióxido de carbono (litoquímio-autotrofismo). Os rendimentos energéticos, em termos de crescimento, são sempre muito baixos (PAYNE and WIEBE 1970).

Foi WINOGRADSKY (1890) quem, pela primeira vez mostrou, duma maneira clara, a existência de organismos que obtinham a sua energia pela oxidação do amoníaco e a utilizavam na captação de dióxido de carbono. No entanto, há bactérias nitrificantes que são capazes de utilizar compostos orgânicos como fonte de carbono (heterotrofismo) (MATIN 1978).

Oxidação de enxofre

As bactérias oxidantes de enxofre incluem géneros como *Thiobacillus* (1.6), *Chromatium* (1.3), *Chlorobium* (1.6) e *Sulfolobus* (3.1). Encontram-se no solo, na água doce, na água salgada, em fontes térmicas, e em resíduos de drenagem ácida de

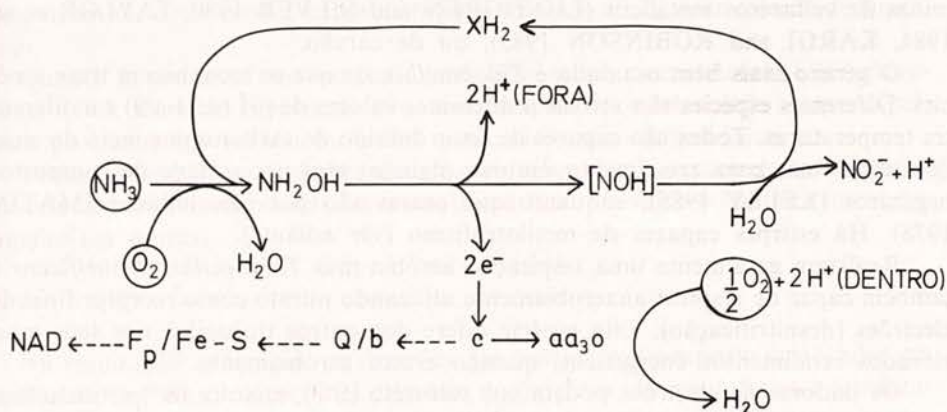


Fig. 5 — Respiração aeróbia de *Nitrosomonas*, em que o dador de electrões é amoníaco e o receptor final, oxigénio. A linha tracejada indica respiração invertida (dependente de energia)

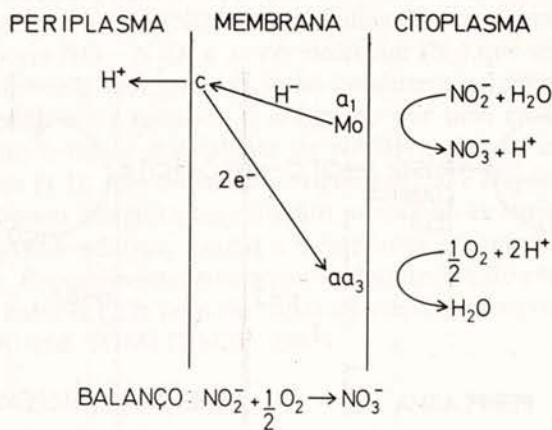


Fig. 6 — Respiração aeróbia de *Nitrobacter*, em que o dador de electrões é nitrito e o receptor final, oxigénio

minas de sulfuretos metálicos (LUNDGREN and SILVER 1980, TAYLOR *et al.* 1984, KARGI and ROBINSON 1985), ou de carvão.

O género mais bem estudado é *Thiobacillus*, de que se reconhecem treze espécies. Diferentes espécies são activas a diferentes valores de pH (de 1 a 9) e a diferentes temperaturas. Todas são capazes de fixar dióxido de carbono por meio do ciclo de Calvin mas, para crescimento óptimo, algumas têm necessidade de compostos orgânicos (KELLY 1985), enquanto que outras são por eles inibidas (MATIN 1978). Há estirpes capazes de metilotrofismo (ver adiante).

Realizam geralmente uma respiração aeróbia mas *Thiobacillus denitrificans* é também capaz de respirar anaerobiamente utilizando nitrato como receptor final de electrões (desnitrificação). Esta espécie difere dos outros tiobacilos nos seus mais elevados rendimentos energéticos, quando cresce aerobiamente.

Os dadores de electrões podem ser: sulfureto (S^{-2}), enxofre (S^0) e tiosulfato ($-S-SO_3^-$), que são oxidados a sulfito (SO_3^{-2}); e ainda sulfito (SO_3^{-2} e politionatos ($-O_3-S-S_n-SO_3^-$) que são oxidados a sulfato (SO_4^{-2}). Uma espécie acidófila, *Thiocabillus ferrooxidans*, tem ainda a capacidade de crescer, autotroficamente, utilizando ferro ferroso (que passa a férrico) como dador de electrões (Fig. 7) da sua respiração aeróbia (JONES 1982).

As *sulfolobales* (3.1) fazem uma respiração aeróbia em que o enxofre elementar é o dador de electrões; a fonte de carbono pode ser orgânica ou inorgânica. Por amplificação dum plasmídeo, algumas espécies de *Sulfolobus* isoladas de sulfataras dos Açores (Furnas e Ribeira Grande) e da Islândia, tornam-se também capazes de realizar uma respiração anaeróbia em que o dador de electrões é o hidrogénio e o receptor final é o enxofre elementar (SEGERER *et al.* 1985, ZILLIG *et al.* 1985).

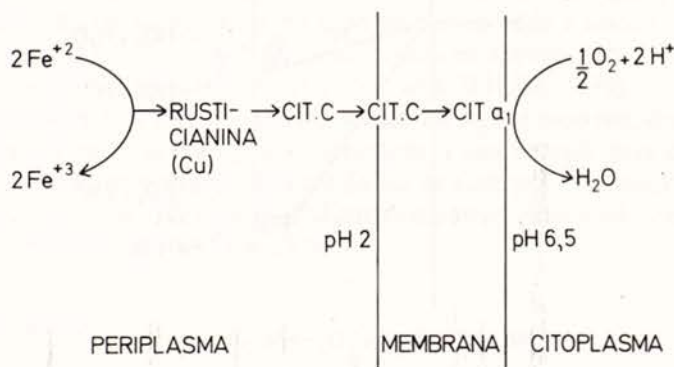


Fig. 7—Respiração aeróbia de *Thiobacillus ferrooxidans*, em que o dador de electrões, é ferro ferroso e o receptor final, oxigénio

Comportam-se, deste modo, como as *thermoproteales* (3.2), suas colegas de super-reino.

Quanto às restantes bactérias oxidantes de enxofre, cromatiáceas (1.3) e clorobiáceas (1.6), além de utentes de processos respiratórios, elas utilizam principalmente processos fotossintéticos, pelos quais são mais conhecidas.

Todas as bactérias oxidantes de enxofre acumulam enxofre elementar, quer extracelularmente (clorobiáceas e a cromatiácea *Ectothiorhodospira*) quer intracelularmente (as outras).

Desnitrificação

Na respiração anaeróbia, os electrões das cadeias de transporte localizadas em membranas têm um receptor final diferente do oxigénio. Já nos referimos à utilização de nitrato como fonte de azoto (redução assimilativa), em que o nitrato é reduzido a nitrito e este a amoníaco. Tratemos agora dos processos em que o nitrato substitui o oxigénio como receptor final de electrões (redução dissimilativa e desnitrificação). As bactérias desnitrificantes conduzem estes processos facultativamente, na ausência de oxigénio (DELWICHE and BRYAN 1976, KNOWLES 1982) embora possam fazê-los em presença de oxigénio, em concentrações dependentes dos organismos. O fenómeno da desnitrificação em presença de oxigénio tem o nome de *desnitrificação aeróbia*, que é distinta da *co-respiração*, isto é, concomitante respiração aeróbia e anaeróbia (ROBERTSON and KUENEN 1984).

Os dadores de electrões são idênticos aos utilizados na respiração aeróbia (ver os exemplos dados para *E. coli* e para *Th. denitrificans*). Encontrou-se desnitrificação em vários organismos capazes de utilizar a celulose como único dador de electrões, mas somente desde que o oxigénio estivesse presente: co-respiração (SOMMER and OTTOW 1985); em condições anaeróbias estritas não se detectou desnitrificação.

A desnitrificação compreende duas partes: redução dissimilativa, em que o nitrato (NO_3) é reduzido a nitrito (NO_2); e desnitrificação propriamente dita, em que o nitrito é reduzido via $\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$, a azoto molecular (N_2) que se liberta. *Escherichia coli* (1.3) e *Klebsiella aerogenes* (1.3) só conduzem a redução dissimilativa, sendo o nitrito seguidamente reduzido a amoníaco por uma enzima não ligada a membranas, a nitrito-redutase dependente de NADH_2 . Outras eubactérias como *Bacillus licheniformis* (1.1), *Pseudomonas aeruginosa* (1.3) e *Hyphomicrobium* (1.3) levam a cabo o processo integral (dissimilação) possuindo as enzimas respiratórias nitrato-redutase e nitrito-redutase, ligadas a membranas, e contendo vários citocromos (JONES 1982). Recentemente, encontrou-se desnitrificação em *Halobacterium*, uma arquebactéria halófila (2.2) também capaz de respiração aeróbia e de fotossíntese (HOCHSTEIN and TOMLINSON 1985).

Sulfato-redução

Trata-se duma respiração anaeróbia obrigatória, em que o receptor final de electrões é o sulfato (SO_4^{2-}) e o dador é um composto orgânico (lactato, piruvato)

ou o hidrogénio. A fonte de carbono é o mesmo composto orgânico que dá os electrões, ou o acetato, quando o dador é o hidrogénio (caso pouco conhecido de litoquímio-heterotrofismo).

Os organismos que conduzem este processo são bactérias dos géneros *Desulfovibrio* e *Desulfotomaculum* (1.4), que habitam fundos aquáticos lamacentos onde são responsáveis pela formação mal-cheirosa de sulfureto e pela deposição de minérios.

Uma característica interessante desta respiração anaeróbia é a natureza solúvel de muitos dos constituintes da sua cadeia de transporte de electrões. A hidrogenase e o citocromo c_3 estão no espaço periplásmico (entre a membrana e a parede); ferredoxina, flavodoxina, várias redutases e o sistema fosforoclástico do piruvato estão no citoplasma; e só a lactato-desidrogenase, a metaquinona e os citocromos b e c estão embebidos na membrana (JONES 1982).

Os relativamente escassos resultados experimentais conhecidos indicam que os sulfato-redutores catalisam, além duma fosforilação associada a membranas, e ligada à respiração anaeróbia, também uma fosforilação ao nível do substrato, ligada a processo fermentativo.

O hidrogénio como dador de electrões

A oxidação de hidrogénio, ligada a uma cadeia de transporte de electrões, é um fenómeno muito espalhado. Já nos referimos a casos em que o receptor de electrões é o oxigénio (BOWIEN and SCHEGEL 1981), o fumarato, o nitrato (INGLEDEW and POOLE 1984), e o sulfato (JONES 1982). Mas pode ainda o receptor ser ferro férrico (Fe^{+3}) que passa a ferroso (Fe^{+2}) como acontece em espécies de *Bacillus* (1.1) e de *Pseudomonas* (1.3); ou o enxofre molecular, em cromatiáceas (1.3), *thermoproteales* (3.2), *sulfolobales* (3.1) e em arqueobactérias metanogénicas (2.2) (STETTER and GAAG 1983).

As arqueobactérias metanogénicas, como o nome indica, ainda produzem metano a partir de H_2 (dador de electrões) e de CO_2 (receptor final de electrões) (LARGE 1983). Mas a metanogénese pode envolver outros substratos, em processos de respiração anaeróbia, em que intervêm várias coenzimas (KELTJENS 1984, VOGELS *et al.* 1984):

1. $CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$ (Fig. 8)
2. $4HCOO^- + 4H^+ \rightarrow CH_4 + 2H_2 + 3CO_2$
3. $4CO + 2H_2O \rightarrow CH_4 + 3CO_2$
4. $CH_3COO^- + H^+ \rightarrow CH_4 + CO_2$
5. $4CH_3OH \rightarrow CH_4 + CO_2 + 2H_2O$
6. $4CH_3NH_2 + 2H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2NH_3$
7. $2(CH_3)_2NH + 2H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2NH_3$
8. $4(CH_3)_3N + 6H_2 \rightarrow 9CH_4 + 3CO_2 + 4NH_3$

As bactérias metanogénicas que utilizam hidrogénio e CO_2 são muitas vezes epi- ou endo-simbiontes de ciliados anaeróbios (VAN BRUGGEN *et al.* 1983, VOGELS *et al.* 1984).

Nos vários casos em que o hidrogénio funciona como dador de electrões, a respiração é geralmente anaeróbia (receptor: fumarato, nitrato, sulfato, ferro férrico, enxofre, dióxido de carbono), mas pode ser aeróbia (receptor, oxigénio). A fonte de carbono é em via de regra o dióxido de carbono, embora uma fonte de carbono orgânica possa ser utilizada por alguns organismos.

Além do processo de respiração anaeróbia, em que ferro férrico é reduzido pelo hidrogénio, e do processo de respiração aeróbia, em que ferro ferroso é oxidado pelo oxigénio, são conhecidas outras transformações químicas bacterianas de metais de que damos uma lista elaborada por SUMMERS e SILVER (1978).

Redução: As (V), Fe (III), Hg (I), Hg (II), Mn (IV), Se (IV), Te (IV).

Oxidação: As (III), Fe (0), Fe (II), Mn (II), Sb (III).

Metilação: As (V), Cd (II), Hg (II), Pb (II), Se (IV), Sn (II), Te (IV).

Metilotrofismo

O metilotrofismo é um tipo de respiração aeróbia, ou anaeróbia (em que o receptor de electrões é o nitrato), caracterizado por os dadores de electrões serem compostos com um único átomo de carbono. Estes compostos podem ser: metano (CH_4), metanol (CH_3OH), formaldeído (HCHO), formato (HCOOH), formamida (HCONH_2), cianeto (CN^-), monóxido de carbono (CO), metilamina (CH_3NH_2), e outros. O metilotrofismo é obrigatório nos géneros *Methylomonas*, *Methylosinus* e *Methylophylus* (1.3), onde é acompanhado de heterotrofismo. Metilotrofismo facultativo, também com heterotrofismo, encontra-se em espécies de eubactérias dos géneros *Pseudomonas* (1.3), *Bacillus* (1.1), *Arthrobacter* (1.1), *Hyphomicrobium* (1.3) e em espécies de leveduras (5.3) dos géneros *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* e *Torulopsis*. Metilotrofismo facultativo com autotrofismo é utilizado por eubactérias como *Rhodospseudomonas* (1.3), que também obtém energia por fotossíntese, e *Thiobacillus*, que também faz oxidação de enxofre (ver atrás).

Em bactérias a fixação de dióxido de carbono, quando este é a principal fonte de carbono (autotrofismo), é levada a cabo via ciclo de Calvin; no heterotrofismo, em que a fonte de carbono é essencialmente orgânica, há alguma fixação de dióxido de carbono pela via metabólica da serina. A via da serina ainda assimila carbono orgânico, sob a forma de formaldeído, o que também é realizado pela via da hexulose-fosfato (Fig. 9). Em leveduras, o formaldeído é fixado pela via da di-hidroxiacetona (LARGE 1983).

Fotossíntese

A energia luminosa é captada por pigmentos fotossintéticos cuja excitação produz estados singletos electrónicos móveis, os excitões. O processo da migração dos excitões, até serem canalizados para os centros reactivos fotossintéticos, tem sido descrito como um passeio aleatório (DREWS 1985). Assim se iniciaria o processo

donde provêm o gradiente protónico e o potencial de membrana, conducentes à fosforilação.

São conhecidos três tipos de processos fotossintéticos (JONES 1982): a fotossíntese dependente de clorofilas, característica de plantas (5.5), algas (5.2) e cianobactérias (1.2); a fotossíntese dependente de bacterioclorofilas, mediada por rodospiriláceas (1.3), cromatiáceas (1.3), clorobiáceas (1.6) e cloroflexáceas (1.5); e a fotossíntese dependente de bacteriorrodopsina, das arqueobactérias halófilas (2.2). Outros fotopigmentos, característicos de cada grupo de organismos, estão indicados no Quadro 5. Os dadores de electrões exteriores propiciam, além da produção de energia, produção de poder redutor, adjunta ao processo fotossintético. Este poder redutor e a energia são em parte utilizados, por muitos organismos, na fixação de dióxido de carbono, por mecanismos de que tratámos atrás (ciclo de Calvin, ciclo de Krebs invertido). Devemos, no entanto, realçar que a redução de carbono inorgânico pela célula, com energia e poder redutor derivados da fotossíntese (fotoautotrofismo), não é comum a todos os seres capazes de fotossíntese, realizando muitos deles um foto-heterotrofismo.

Tanto a fotossíntese dependente de clorofilas (GLAZER 1983), como a fotossíntese dependente de bacterioclorofilas (BARBER 1985) compreendem um transporte de electrões cíclico, que conduz só à formação de ATP, e um transporte de electrões acíclico com um dador de electrões exterior (e utilizando, em parte, centros reactivos idênticos aos do transporte cíclico), que leva à produção de ATP e de coenzimas reduzidas (poder redutor). Várias células em determinadas condições, somente conduzem o transporte cíclico; são disto exemplo os heterocistos de cianobactérias filamentosas (ver atrás, a propósito da fixação de azoto).

QUADRO 5

Pigmentos e dadores exteriores de electrões em processos fotossintéticos

Organismos	Fotopigmentos	Dadores de e ⁻
rodófitos (5.2)	clorofila a, β -caroteno, ficobiliproteínas	H ₂ O
outros eucariontes: outras algas (5.2) e plantas (5.5)	clorofilas a+b/a+c, β -caroteno, outros	H ₂ O
cianobactérias (1.2)	clorofila a, β -caroteno, ficobiliproteínas	H ₂ O, S ⁻²
rodospiriláceas (1.3)	bacterioclorofilas a/b, licopeno, espiriloxantina	H ₂ , ácidos orgânicos
cromatiáceas (1.3)	bacterioclorofila a, licopeno, espiriloxantina	H ₂ , ácidos orgânicos S ⁻² , S ⁰ , SO ₃ ⁻²
clorobiáceas (1.6)	bacterioclorofilas a+c/d/e, clorobacteno	H ₂ , ácidos orgânicos S ⁻² , S ⁰ , SO ₃ ⁻²
cloroflexáceas (1.5)	bacterioclorofilas a+c, β -caroteno, γ -caroteno	S ⁻² , ácidos orgânicos
arqueobactérias halófilas (2.2)	bacteriorrodopsina, halorrodopsina	—

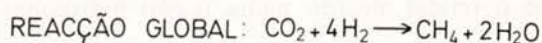
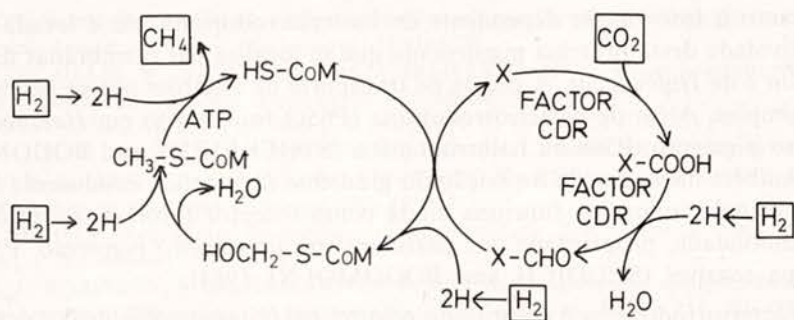


Fig. 8 — Metanogénese: respiração anaeróbia em que o dador de electrões é hidrogénio e o receptor final, dióxido de carbono. X: transportador desconhecido; CoM: coenzima M

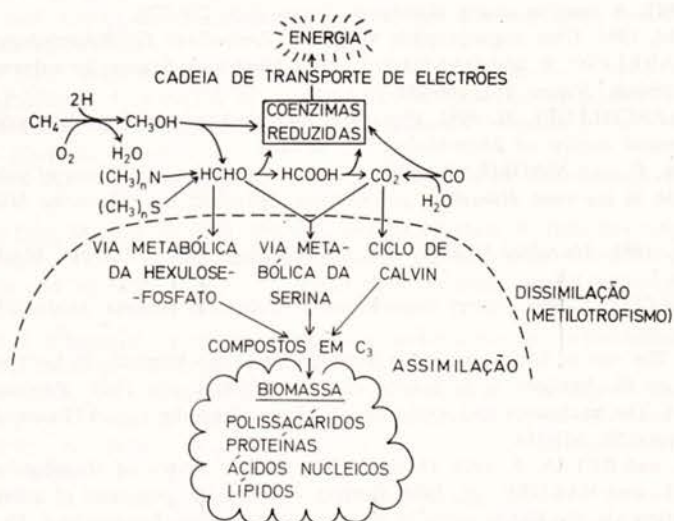


Fig. 9 — Dissimilação e assimilação em organismos metilotróficos

Quanto à fotossíntese dependente de bacteriorrodopsina, ela é levada a cabo pela actividade desta proteína pigmentada que se localiza nas membranas de *Halobacterium* e de *Halococcus*. A cadeia de transporte de electrões parece ser extremamente simples. Além de bacteriorrodopsina (P650) foi descrito em *Halobacterium* um outro pigmento, P588 ou halorrodopsina (STOEKENIUS and BOGOMOLNI 1982), também mediador da formação do gradiente de protões, conducente à fosforilação. A halorrodopsina funciona ainda como receptor fototáctico, relacionado com a motilidade, propriedade que partilha com um terceiro pigmento, P565, ou rodopsina sensível (SPUDICH and BOGOMOLNI 1984).

A bacteriorrodopsina é constituída pelo retinal (vitamina A-aldeído) covalentemente ligada, por um residuo de lisina, à proteína bacteriopsina. Estudos de natureza física indicaram que cada molécula de bacteriorrodopsina contém sete regiões, em configuração de hélice α , que estão orientadas perpendicularmente ao plano da membrana (JONES 1982). A translocação de protões far-se-ia através dum canal hidrófilo, encontrando-se o retinal alojado numa região hidrófoba.

Colaboração imprescindível

Maria do Carmo Martins Varela dactilografou. Ricardo Nunes Madeira Lopes desenhou as figuras.

BIBLIOGRAFIA

- AMZEL, L. and PEDERSEN, P. 1983. Proton ATPases: structure and mechanism. *Annual Review of Biochemistry* 52, 801-824.
- BARBER, J. 1985. A reaction centre elucidated. *Nature* 315, 278-279.
- BEIJERINCK, M. 1901. Über oligonitrophile Mikroben. *Zentralblatt für Bakteriologie* II-7, 561-582.
- BELAY, N., SPARKLING, R. and DANIELS, L. 1984. Dinitrogen fixation by a thermophilic methanogenic bacterium. *Nature* 312, 286-288.
- BOWIEN, B. and SCHLEGEL, H. 1981. Physiology and biochemistry of aerobic hydrogen-oxidizing bacteria. *Annual Review of Microbiology* 35, 405-452.
- CABEÇA-SILVA, C. and MADEIRA-LOPES, A. 1984. Temperature relations of yield, growth and thermal death in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie* 24, 129-132.
- CAMPBELL, R. 1983. *Microbial Ecology. Basic Microbiology*, Vol. 5, 191 pps. Blackwell Scientific Publications.
- COBLEY, J. and COX, J. 1983. Energy conservation in acidophilic bacteria. *Microbiological Reviews* 47, 579-595.
- CORI, C. 1976. The role of lactic acid in the development of biochemistry. In Kornberg *et al.* (eds). *Reflections on Biochemistry* — in honour of Severo Ochoa, pps 17-26. Pergamon Press.
- CROSS, R. 1981. The mechanism and regulation of ATP synthesis by F_1 -ATPases. *Annual Review of Biochemistry* 50, 681-714.
- DELWICHE, C. and BRYAN, B. 1976. Denitrification. *Annual Review of Microbiology* 30, 241-262.
- DIJKHVIZEN, L. and HARDER, W. 1984. Current views on the regulation of autotrophic carbon dioxide fixation via the Calvin cycle in bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 50, 473-487.
- DOELLE, H. 1975. *Bacterial Metabolism*. Academic Press. 737pps.
- DREWS, G. 1985. Structure and functional organization of light-harvesting complexes and photochemical reaction centers in membranes of phototrophic bacteria. *Microbiological Reviews* 49, 59-70.

- FERGUSON, S. and SORBATO, M. 1982. Proton electrochemical gradients and energy transduction processes. *Annual Review of Biochemistry*, 51, 185-217.
- FISCHER, F., ZILLIG, W., STETTER, K. and SCHREIBER, G. 1983. Chemolithoautotrophic metabolism of anaerobic extremely thermophilic archaeobacteria. *Nature* 301, 511-513.
- FOX, G., STACKEBRANDT, E., HESPELL, R., GIBSON, J., MANILOFF, J., DYER, T., WOLFE, R., BALCH, W., TANNER, R., MAGRUM, L., ZABLEN, L., BLAKEMORE, R., GUPTA, R., BONNEN, L., LEWIS, B., STAHL, D., LEUHRSEN, K., CHEN, K. and WOESE, C. 1980. The phylogeny of prokaryotes. *Science* 209, 457-463.
- GLAZER, A. 1983. Comparative biochemistry of photosynthetic light-harvesting systems. *Annual Review of Biochemistry* 52, 125-157.
- GOLDEN, J., ROBINSON, S. and HASELKORN, R. 1985. Rearrangement of nitrogen fixation genes during heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena*. *Nature* 314, 419-423.
- GRAY, M. and DOOLITTLE, F. 1982. Has the endosymbiont hypothesis been proven? *Microbiological Reviews* 46, 1-42.
- HENDERSON, E., OAKES, M., CLARK, M. and LAKE, J. 1984. A new ribosome structure. *Science* 225, 510-512.
- HERS, H. and HUE, L. 1983. Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Annual Review of Biochemistry* 52, 617-653.
- HINKLE, P. and McCARTY, R. 1978. How cells make ATP. *Scientific American* 238 (3) 104-123.
- HOCHSTEIN, L. and TOMLINSON, G. 1985. Denitrification by extremely halophilic bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 27, 329-331.
- INGLEDEW, W. and POOLE, R. 1984. The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews* 48, 222-271.
- JONES, C. 1976. *Biological Energy Conservation. Outline Studies in Biology*. Chapman and Hall. 64 pps.
- JONES, C. 1982. *Bacteriological Respiration and Photosynthesis. Aspects of Microbiology* 5. 90 pps. Nelson.
- KARGI, F. and ROBINSON, M. 1985. Biological removal of pyritic sulfur from coal by the thermophilic organism *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biotechnology and Bioengineering* 27, 41-49.
- KELLY, D. 1985. Physiology of the thiodacilli: elucidating the sulphur oxidation pathway. *Microbiological Sciences* 2, 105-109.
- KELTJENS, J. 1984. Coenzymes of methanogenesis from hydrogen and carbon dioxide. *Antonie van Leeuwenhoek* 50, 383-396.
- KNOWLES, R. 1982. Denitrification. *Microbiological Reviews* 46, 43-70.
- LAKE, J., HENDERSON, E., OAKES, M. and CLARK, M. 1984. Eocytes: a new ribosome structure indicates a kingdom with a close relationship to eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81, 3786-3790.
- LARGE, P. 1983. *Methylophony and Methanogenesis. Aspects of Microbiology* 8, 88 pps. Van Nostrand.
- LEMONS-CAROLINO, M., MADEIRA-LOPES, A. and VAN UDEN, N. 1982. The temperature profile of the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie* 22, 705-709.
- LUNDGREN, D. and SILVER, M. 1980. Ore Leaching by bacteria. *Annual Review of Microbiology* 34, 263-283.
- LURIA, S. 1960. The bacterial protoplasm: composition and organization. In Gunsalus, I. and Stanier, R. (eds). *The Bacteria*, vol. I, pps 1-34. Academic Press.
- MADEIRA-LOPES, A. 1981. Grandes grupos, genética e evolução. *Brotéria Genética* 2, 13-14.
- MADEIRA-LOPES, A. 1982a. O lugar das bactérias no mundo vivo. *Naturalia* (nova série) 2, 17-23.
- MADEIRA-LOPES, A. 1982b. Glucose-less death in yeast at supra-maximal temperatures. *Ciência Biológica* 7, 59-64.
- MADEIRA-LOPES, A. 1984a. O mundo dos micróbios. *Ciência Actual* 1, 14-16.
- MADEIRA-LOPES, A. 1984b. O conceito de três super-reinos e o seu fundamento genético. *Brotéria Genética* 5, 9-12.
- MADEIRA-LOPES, A. 1985a. The influence of temperature on the relations between thermal death, growth and yield in *Candida utilis*. *Journal of Basic Microbiology*, 25, 39-42.

- MADEIRA-LOPES, A. 1985b. Aspectos genéticos dos eóцитos. *Brotéria Genética* 6, 5-6.
- MADEIRA-LOPES, A. and CABEÇA-SILVA, C. 1984. The dependence on temperature of thermal death, growth and yield of *Candida tropicalis*. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie* 24, 133-135.
- MADEIRA-LOPES, A., PLÁCIDO, T. and CABEÇA-SILVA, C. 1986. Comparative study of the temperature profiles of growth and death of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* and the non-pathogenic *Cr. albidus*. *Journal of Basic Microbiology* (no prelo).
- MADEIRA-LOPES, A. and VAN UDEN, N. 1982. The temperature profile of *Cryptococcus neoformans*. *Sabouraudia* 20, 331-334.
- MARGULIS, L. 1981. *Symbiosis in Cell Evolution: Life and its Environment on the Early Earth*. Freeman and Company, 419 pps.
- MATIN, A. 1978. Organic nutrition of chemolithotrophic bacteria. *Annual Review of Microbiology* 32, 443-468.
- MIZIORKO, H. and LORIMER, G. 1983. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase. *Annual Review of Biochemistry* 52, 507-535.
- MURRAY, P. and ZINDER, S. 1984. Nitrogen fixation by a methanogenic archaeobacterium. *Nature* 312, 284-286.
- ORMEROD, J. 1983. The carbon cycle in aquatic ecosystems. In Slater, J., Whittenbury, R. and Wimpenny, J. (eds). *Microbes in Their Natural Environments*. Cambridge University Press. pps 463-482.
- PAYNE, W. and WIEBE, W. 1978. Growth yield and efficiency in chemosynthetic microorganisms. *Annual Review of Microbiology* 32, 155-183.
- POSTGATE, J. 1978. *Nitrogen Fixation. Studies in Biology* n.º 98. Edward Arnold, 67 pps.
- ROSE, A. 1976. *Chemical Microbiology: An Introduction to Microbial Physiology*. Butterworths. 469 pps.
- ROBERTSON, L. and KUENEN, J. 1984. Aerobic denitrification — old wine in new bottles? *Antonie van Leeuwenhoek* 50, 525-544.
- ROBSON, R. and POSTGATE, J. 1980. Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. *Annual Review of Microbiology* 34, 183-207.
- ROGERS, P., GOODMAN, A. and HEYES, R. 1984. *Zymomonas ethanol fermentations. Microbiological Sciences* 1, 133-136.
- SEGERER, A., STETTER, K. and KLINK, F. 1985. Two contrary modes of chemolithotrophy in the same archaeobacterium. *Nature* 313, 787-789.
- SHAVIT, U. 1980. Energy transduction in chloroplasts: structure and function of the ATPase complex. *Annual Review of Biochemistry* 49, 111-138.
- SLATER, E. 1976. Bioenergetics: past, present and future. In Kornberg *et al.* (eds). *Reflections on Biochemistry* — in honour of Severo Ochoa, pps 45-55. Pergamon Press.
- SOMMER, K. und OTTOW, J. 1985. Denitrifikation mit Cellulose als einzigem Wasserstoffdonator. *Journal of Basic Microbiology* 25, 77-80.
- SPENCER-MARTINS, I. and VAN UDEN, N. 1982. The temperature profile of growth, death and yield of the starch-converting yeast *Lipomyces kononenkoae*. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie* 22, 503-505.
- SPUDICH, J. and BOGOMOLNI, R. 1984. Mechanism of colour discrimination by a bacterial sensory rhodopsin. *Nature* 312, 509-513.
- STACKEBRANDT, E. and WOESE, C. 1984. The phylogeny of prokaryotes. *Microbiological Sciences* 1, 117-122.
- STANIER, R., ADELBERG, E. and INGRAHAM, J. 1976. *General Microbiology*. The MacMillan Press Ltd. 871 pps.
- STETTER, K. and GAAG, G. 1983. Reduction of molecular sulphur by methanogenic bacteria. *Nature* 305, 309-311.
- STEWART, W. 1980. Some aspects of structure and function in N₂ — fixing cyanobacteria. *Annual Review of Microbiology* 34, 497-536.
- STEWART, W. 1983. Natural environments — challenges to microbial success and survival. In Slater, J., Whittenbury, R. and Wimpenny, J. (eds). *Microbes in Their Natural Environments*. Cambridge University Press. pps 1-35.

- STOECKENIUS, W. and BOGOMOLNI, A. 1982. Bacteriorhodopsin and related pigments of halobacteria. *Annual Review of Biochemistry* 51, 587-616.
- SUMMERS, A. and SILVER, S. 1978. Microbial transformations of metals. *Annual Review of Microbiology* 32, 637-672.
- TANFORD, C. 1983. Mechanism of free energy coupling in active transport. *Annual Review of Biochemistry* 52, 379-409.
- TAYLOR, B., WHEELER, M. and NORDSTROM, D. 1984. Isotope composition of sulphate in acid mine drainage as measure of bacterial oxidation. *Nature* 308, 538-541.
- VAN BRUGGEN, J., STUMM, C. and VOGELS, G. 1983. Symbiosis of methanogenic bacteria and sapropelic protozoa. *Archives of Microbiology* 136, 89-95.
- VAN UDEN, N. and MADEIRA-LOPES, A. 1975. Dependence of the maximum temperature for growth of *Saccharomyces cerevisiae* on nutrient concentration. *Archives of Microbiology* 104, 23-28.
- VAN UDEN, N. and MADEIRA-LOPES, A. 1976. Yield and maintenance relations of yeast growth at superoptimal temperatures. *Biotechnology and Bioengineering* 18, 791-804.
- VAN VALEN, L. and MAIORAMA, V. 1980. The archaeobacteria and eukaryotic origins. *Nature* 287, 248-250.
- VOGELS, G., VAN DER DRIFT, C., STUMM, C., KELTJENS, J. and ZWART, K. 1984. Methanogenesis: surprising molecules, microorganisms and ecosystems. *Antonie van Leeuwenhoek* 50, 557-567.
- WALLACE, D. 1982. Structure and evolution of organelle genomes. *Microbiological Reviews* 46, 208-240.
- WINOGRADSKY, S. 1890. Sur les organismes de la nitrification. *Comptes Rendues des Séances de l'Académie des Sciences* 110, 1013-1016.
- WOESE, C., MAGRUM L. and FOX, G. 1978. Archaeobacteria. *Journal of Molecular Evolution* 11, 245-252.
- WOESE, C. 1979. A proposal concerning the origin of life on the planet earth. *Journal of Molecular Evolution* 13, 95-101.
- WOESE, C. and GUPTA, R. 1981. Are archaeobacteria merely derived «prokaryotes»? *Nature* 289, 95-96.
- ZILLIG, W., YEATS, S., HOLZ, I., BOCK, A., GROPP, F., RETTENBERGER, M. and LUTZ, S. 1985. Plasmid-related anaerobic autotrophy of the novel archaeobacterium *Sulfolobus ambivalens*. *Nature* 313, 789-791.

Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page. The text is arranged in several paragraphs and appears to be a formal document or report.

O MECANISMO DA TRANSDUÇÃO GENERALIZADA

Hermínia de Lencastre

Laboratório de Genética Molecular, Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal.
Secção de Biotecnologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

ABSTRACT

Generalized transduction in bacteria is reviewed in the present paper. The place and meaning of this gene transfer process in nature and in the context of genetics, as well as in contrast to specialized transduction, are first characterized. The mechanisms leading to the production of transducing lysates are summarized. This includes conditions for phage adsorption to donor bacteria, cellular uptake of phage DNA, intracellular processes leading to the formation of viral and transducing particles, and lysis of the donor cells. The molecular mechanisms of the process of generalized transduction itself are then considered, including the different fates of the transducing DNA. Special emphasis is given to the various systems of generalized transduction in *Bacillus subtilis*.

LOCALIZAÇÃO E SIGNIFICADO DA TRANSDUÇÃO EM GENÉTICA

Transdução é o processo conducente à alteração hereditária de uma bactéria através da expressão de DNA estranho que lhe é injectado por um bacteriófago (LEDERBERG *et al.* 1951; ZINDER & LEDERBERG 1952).

A descoberta da transdução surgiu na sequência dos trabalhos pioneiros de GRIFFITH (1928) e AVERY, MACLEOD e MCCARTHY (1944) sobre transformação e de LEDERBERG & TATUM (1946) sobre conjugação.

Transformação é também um processo que conduz a alterações hereditárias através da expressão de DNA alheio. Mas esse DNA, em vez de injectado, penetra por si, isolado e só, através do invólucro celular.

Historicamente, a identificação do DNA como agente responsável pelo fenómeno de transformação e, consequentemente pela transmissão da informação

genética, constituiu uma das etapas fundamentais para o arranque da Genética Molecular.

Conjugação bacteriana é outra via conducente a alterações hereditárias por DNA estranho. Mas exige contacto físico, através de um tubo de conjugação, entre as bactérias dadora e receptora do DNA, sem que, no entanto, se dê citogamia.

Completa *fusão celular* é também possível em bactérias (FÖDOR & AL-FÖLDI 1976, 1979; SCHAEFFER *et al.* 1976) resultando na total comparticipação do conteúdo celular das duas ou, mais células que se fundem. Através de múltiplas recombinações, muito genes são eliminados, e surge um novo genoma, de tamanho normal mas globalmente original.

Os quatro mecanismos referidos, embora diferentes nas condições de acesso, têm em comum a potencialidade de abrir, às bactérias, horizontes de inovação através da partilha de histórias genéticas diferentes.

Como as células bacterianas são haplóides, recombinação entre os seus cromossomas (que são iguais) não conduz a nenhum enriquecimento genético, e só é detectável por métodos físicos.

Para que a recombinação resulte em mudança, com todas as consequências ecológicas e evolutivas, é necessário que a célula seja visitada por DNAs com tradição genética diferente e que aí sejam capazes de se expressar.

Os quatro mecanismos referidos permitem precisamente que se confrontem, num mesmo citoplasma, alternativas genéticas diferentes, as quais podem decidir pela sua coexistência cumulativa ou pela eliminação de algumas em favor de outras, num rearranjo do genoma a que se chama recombinação genética.

A transdução constitui, provavelmente, o principal processo natural de transferência génica no caso das bactérias do solo. De facto, é muito elevado o número de fagos conhecidos nessas bactérias e nomeadamente no género *Bacillus* (ACKERMANN 1974; ACKERMANN & EISENSTARK 1974; HEMP-HILL & WHITELEY 1975). REILLY (1976) refere que lhe foi possível isolar fagos (virulentos e temperados) deste género de bactérias em praticamente todos os tipos de solo estudados.

A classificação dos fagos em temperados e virulentos baseia-se no tipo de interacção que são capazes de estabelecer com a bactéria hospedeira. Os *fagos virulentos* são aqueles que lisam invariavelmente a bactéria que infectam, sendo capazes apenas de seguir o chamado *ciclo lítico*. Os *fagos temperados* têm a possibilidade de, após penetrarem na célula hospedeira, seguirem um de dois ciclos mutuamente exclusivos: *ciclo lítico*, tal como um fago virulento ou (ii) *ciclo lisogénico*, em que o DNA se integra no cromossoma bacteriano sendo, nesta conformação, designado por *profago*.

Conhecem-se numerosos fagos da estirpe *B. subtilis* 168, a mais bem caracterizada do gênero *Bacillus*. Já se provou que alguns destes fagos medeiam transdução (págs. 21-27), provavelmente muitos mais fagos transdutores se encontrarão, desde que se usem técnicas apropriadas.

Em oposição à conjugação, a transdução não exige contacto celular, e em contraste com a transformação, o DNA transdutor encontra-se protegido da acção de nucleases, pela capa proteica viral. Estas circunstâncias parecem fazer da transdução o processo mais favorável para a troca de informação genética entre as bactérias do solo (REILLY 1976).

Também em eucariotas, cada vez se conhecem mais casos em que vírus animais e vegetais medeiam, espontaneamente, transferência funcional de genes de hospedeiro para hospedeiro, fazendo-nos entrever a enorme importância da transdução na evolução das espécies (REANNEY 1976).

Porém, no contexto da adaptação ecológica e evolutiva das bactérias do solo também a transformação poderá ser importante. (GRAHAM & ISTOCK 1978, 1979) mostraram que, no solo, se dá transformação entre estirpes de *B. subtilis* 168.

Infelizmente, a ocorrência dos mecanismos de transferência génica na natureza tem recebido pouca atenção. Só recentemente começaram a ser considerados em maior pormenor, para determinar o grau de consistência de perigos potenciais apontados às técnicas de recombinação artificial de genomas e à transferência espontânea de genes de resistência a antibióticos para bactérias patogénicas (CURTISS 1976; REANNEY 1976).

Até agora, os processos de transferência génica têm sido estudados principalmente para esclarecer o seu mecanismo molecular, e, no caso da transdução em particular, para o mapeamento genético de cromossomas.

DIVERSIDADES PROCESSUAIS EM TRANSDUÇÃO

1. O comum em transdução

O estudo da transdução iniciou-se com a identificação do seu vector na bactéria *Salmonella typhimurium* onde pela primeira vez foi observado (ZINDER & LEDERBERG 1952). Concluiu-se que o fago temperado P22 é vector, estabeleceram-se as características gerais desta transdução, e formulou-se o seu mecanismo em termos globais.

a) Natureza do vector

As partículas transdutoras de um lisado de P22 são idênticas às suas partículas infecciosas no que respeita às suas dimensões (ZINDER & LEDER-

BERG 1952; EBEL-TSIPIS *et al.* 1972a), resistência a desinfectantes bacterianos (ZINDER & LEDERBERG 1952), sensibilidade ao soro anti-fágico (ZINDER 1953) e especificidade de adsorção ao antigénio O da parede celular (ZINDER & LEDERBERG 1952; WRIGHT & KANEGASAKI 1971).

No entanto, o conteúdo informativo dos dois tipos de partículas é diferente, o que foi inicialmente demonstrado por duas linhas de evidência. Em primeiro lugar, *estirpes lisogénicas* (em que o genoma fágico existe integrado no cromossoma bacteriano) impedem a multiplicação de fagos que lhes sejam fornecidos, devido ao mecanismo de imunidade de superinfecção (ZINDER 1958b) mas mantêm inalterada a capacidade de transdução (ZINDER & LEDERBERG 1952).

Em segundo lugar, o tratamento das suspensões de P22 com radiações ultravioletas causa redução da actividade lítica mas aumenta a actividade transdutora (GAREN & ZINDER 1955; BENZINGER & HARTMAN 1962). Também o tratamento com ácido nitroso tem um efeito idêntico na capacidade transdutora e lítica de P22 (ADYE 1962).

b) Características gerais

(i) A transdução é resistente à acção de várias enzimas hidrolíticas como desoxirribonucleases, ribonucleases, pancreatina, taka-díastase e tripsina (ZINDER & LEDERBERG 1952).

(ii) O processo está dependente da capacidade fágica de multiplicação numa bactéria (dadora) e associado à alteração hereditária das células numa cultura geneticamente diferente (receptora) infectada pelo lisado (ZINDER 1958a).

(iii) O vector desta transferência génica pode ser identificado pelos critérios definidos na alínea anterior (págs. 3-4).

c) Mecanismo global

Durante o processo de multiplicação fágica de P22, em células duma estirpe de *S. typhimurium*, pode verificar-se excepcionalmente a encapsulação de algum DNA bacteriano em cabeças fágicas. As partículas assim constituídas são as *partículas transdutoras*.

Se o *lisado* obtido (suspensão de fagos resultante da lise de uma cultura em consequência de multiplicação fágica) for adicionado a culturas duma estirpe geneticamente diferente, algumas das suas células podem adquirir características da estirpe dadora (*células transduzidas* ou *transdutoras*). Estas resul-

tam da penetração e expressão nas células receptoras, do DNA bacteriano dado, transferido pelas partículas transdutoras.

A probabilidade com que o processo de transdução ocorre é avaliada em termos de: (i) *Frequência de transdução* que se define como a razão entre o número de transdutantes e o número de células sobreviventes e (ii) *Eficiência de transdução* definida como o número de transdutantes obtidos por partícula fágica presente na amostra transdutora.

A transdução ocorre em numerosas espécies bacterianas (págs. 27-30). Consideramos no entanto nesta Secção, apenas aqueles sistemas cujo pormenorizado estudo permitiu o esclarecimento, ainda que parcial, dos seus mecanismos.

Por utilização de estirpes dadoras e receptoras apropriadas de *S. typhimurium* demonstrou-se que um mesmo lisado de P22 é capaz de transferir marcas genéticas correspondentes à síntese de aminoácidos, à mobilidade, à resistência a antibióticos, e à capacidade de utilização de determinados hidratos de carbono (ZINDER & LEDERBERG 1952; ZINDER 1953; STOCKER *et al.* 1953).

LENNOX (1955) observou que o fago temperado P1 de *Escherichia coli* também tem capacidade transdutora para virtualmente qualquer marca genética de *E. coli* ou *Shigella dysenteriae*.

MORSE (1954) mostrou que o fago λ de *E. coli* igualmente medeia transdução. Contudo, neste sistema, apenas são transferidos os genes responsáveis pela utilização da galactose (*gal*), que se encontram localizados no cromossoma bacteriano junto do local de inserção de λ , ou os genes responsáveis pela síntese da biotina (*bio*), que se encontram adjacentes à outra extremidade do profago, ou ainda um gene (*sus*) que também se localiza na mesma zona do cromossoma (MORSE 1954; MORSE *et al.* 1956; WOLLMAN 1963; FUERST 1966; EGGERTSSON & ADELBERG 1965).

Igualmente outros fagos de *E. coli* como ϕ 80 (MATSUSHIRO 1963), 82 e 434 (JACOB 1955) ou ϕ 170 (OZEKI & IKEDA 1968) efectuam transdução apenas para as marcas genéticas localizadas de um e outro lado do local de integração do profago.

A transdução foi então subdividida em duas categorias de acordo com a variedade de marcas que podem ser transferidas pelo fago transdutor: qualquer marca, em *transdução generalizada* e uma, ou um número restrito de marcas, em *transdução especializada*.

Verificou-se posteriormente que estes dois tipos de transdução têm outras características a diferenciá-los, e que são fenómenos basicamente distintos no seu mecanismo molecular (OZEKI & IKEDA 1968) como se descreve em seguida.

2. Transdução especializada

a) Características gerais

Além da referida limitação de marcas transferíveis, as principais características comuns aos sistemas de transdução especializada são as seguintes:

(i) As partículas transdutoras formam-se por indução (MORSE *et al.* 1956; WING 1968) de células que contêm profagos, e não por infecção de culturas não lisogênicas. A formação de partículas transdutoras é contudo um acontecimento raro: a eficiência de transdução é da ordem de 10^{-6} a 10^{-7} . Estes lisados são designados LFT por ser também baixa a sua frequência de transdução.

(ii) A indução de alguns dos transdutantes obtidos com os lisados LFT, permite obter lisados com uma elevada frequência de transdução (HFT). Estes lisados contêm números aproximadamente iguais de partículas transdutoras e de partículas infecciosas. As colônias transduzidas segregam, na descendência, bactérias com o genótipo inicial do receptor, o que permitiu concluir que são *heterogenontes*, que contêm a marca transduzida do dador de o alelo mutante do receptor. As colônias transduzidas são sempre imunes à superinfecção pelo mesmo fago.

(iii) As partículas transdutoras contêm DNA bacteriano e DNA fágico covalentemente ligados (CAMPBELL 1962; SMITH 1968). Em geral são defectivas para a formação de placas fágicas por falta da região correspondente do genoma fágico (CAMPBELL 1960).

b) Mecanismo de formação das partículas transdutoras especializadas

O modo de formação das partículas transdutoras foi estabelecido por CAMPBELL (1962) para o sistema *E. coli*. O «modelo de Campbell» permite explicar a integração de um fago temperado no cromossoma bacteriano, o que conduz à lisogenação da célula. Através de uma zona de homologia entre o cromossoma bacteriano e o genoma fágico (em forma circularizada) dá-se o emparelhamento, corte, e entrecruzamento («crossing-over») recíproco entre as duas moléculas de DNA, o que conduz à inserção linear do fago no cromossoma da bactéria.

O acontecimento inverso da lisogenação é a excisão do profago, que se verifica após indução por agentes vários como as radiações ultravioletas, a mitomicina C, a carência de timina e outros (BOREK & RYAN 1973).

A excisão pode resultar do emparelhamento e entrecruzamento entre as duas zonas homólogas que determinaram a lisogenação. Liberta-se desta forma um genoma idêntico ao que se tinha integrado.

Contudo, se a excisão se der através da recombinação entre duas zonas de homologia ilegítima (acontecimento raro) uma no DNA do fago e outra no DNA da bactéria, liberta-se um genoma constituído por material genético do fago e pela zona adjacente do cromossoma da bactéria. Deste modo, a excisão do profago λ pode originar uma molécula constituída por parte do genoma de λ e por todo ou parte do operão *gal*. As partículas que incluam este material genético são capazes de transduzir os genes *gal*; são defectivas no sentido de serem incapazes de formar placas por não conterem, completa, a respectiva zona do genoma de λ , e por isso denominadas *λdg*.

Obteve-se evidência experimental por métodos genéticos e físicos de que as partículas transdutoras deste tipo contêm DNA bacteriano e fágico covalentemente ligados (OZEKI & IKEDA 1968).

3. Transdução generalizada

a) Características gerais

(i) Qualquer marca do cromossoma da bactéria pode ser transferida (pág. 5).

(ii) As várias marcas genéticas são, em geral, transferidas independentemente, isto é, a célula que é transduzida para uma determinada marca, permanece normalmente inalterada para as restantes (ZINDER & LEDERBERG 1952; ZINDER 1953).

(iii) Pode, no entanto, observar-se *co-transdução* sobretudo para marcas que se encontram muito próximas no cromossoma bacteriano (*marcas ligadas*). STOCKER *et al.* (1953) demonstraram pela primeira vez a ocorrência deste fenómeno em culturas de *S. typhimurium* infectadas com P22. A frequência de co-transdução entre duas marcas varia inversamente com a distância entre elas (LENNOX 1955), e por isso permite o mapeamento genético do cromossoma, o que tem constituído a principal aplicação da transdução génica.

(iv) As partículas transdutoras podem formar-se durante a multiplicação dos fagos após infecção de uma cultura por um fago temperado ou virulento, e também por indução de culturas lisogénicas. Independentemente da extensão da lise obtida, a eficiência de transdução para uma dada marca é da ordem de 10^{-8} a 10^{-5} .

Este baixo valor provém, em parte, de as partículas transdutoras de um lisado estarem representadas em número muito inferior ao das partículas fágicas. Este facto foi demonstrado em lisados transdutores de P1 por ARBER (1960) e IKEDA & TOMIZAWA (1965a) usando metodologias diferentes, e em lisados de P22 por EBEL-TSIPIS *et al.* (1972a).

b) Mecanismo geral de formação das partículas transdutoras generalizadas

Supôs-se, durante muito tempo, que, em transdução generalizada, as partículas transdutoras se formariam por um mecanismo idêntico ao descrito atrás (pág. 6) para a transdução especializada.

As experiências de IKEDA & TOMIZAWA (1965a) foram as primeiras a mostrar que nas partículas transdutoras de PI não existe DNA fágico e que, conseqüentemente, o mecanismo de gênese dessas partículas teria que ser diferente.

Segundo o modelo apresentado por OZEKI & IKEDA (1968) e posteriormente confirmado, a gênese das partículas transdutoras nos sistemas de transdução generalizada, está intimamente associada ao mecanismo de maturação fágica (pág. 13).

Após penetração, numa célula, do DNA fágico, dá-se a sua replicação e expressão, com a conseqüente síntese de proteínas virais estruturais. Estas irão formar a cabeça e a cauda das partículas do lisado. A encapsulação do DNA fágico nas cabeças proteicas origina partículas fágicas maduras. A encapsulação de fragmentos de DNA bacteriano em idênticas cabeças, origina partículas transdutoras.

SCHMIEGER (1970) defendeu que as partículas transdutoras de lisados de P22 contêm, covalentemente ligado ao DNA bacteriano replicado antes da infecção, uma pequena quantidade (10%) de DNA fágico recém-sintetizado.

Contudo este resultado está em desacordo com trabalhos posteriores de EBEL-TSIPIS et al. (1972a). Este autores mostraram, por um lado, que as partículas transdutoras contêm DNA bacteriano sintetizado antes da infecção, e, por outro, que a formação destas partículas se pode verificar na ausência de qualquer sistema de recombinação. Em bactérias *Rec⁻* (deficientes no mecanismo de recombinação bacteriana) infectadas com fagos mutantes *Erf⁻* (deficientes no processo de recombinação fágica) (BOTSTEIN & MATZ 1970) forma-se um número normal de partículas transdutoras. Esta observação torna pouco provável que a molécula de DNA transdutor seja constituída por DNAs bacteriano e fágico covalentemente ligados. Estas experiências mostraram também que partículas transdutoras e fágicas têm gênese independente, já que em células *Rec⁻* infectadas com fagos *Erf⁻*, a quantidade de DNA fágico sintetizado é muito pequena (BOTSTEIN & MATZ 1970) e no entanto o número de partículas transdutoras é normal (EBEL-TSIPIS et al. 1972a).

A estrutura do DNA transdutor foi também examinada em três fagos de *B. subtilis*: SP10 (pág. 22) PBS2 (pág. 25) e SPP1 (pág. 26) em que se verificou que as partículas transdutoras têm apenas DNA bacteriano.

MECANISMOS DA FORMAÇÃO DOS LISADOS TRANSDUTORES GENERALIZADOS

As partículas transdutoras generalizadas formam-se durante o processo da multiplicação fágica. Além disso, a sua posterior adsorção às células receptoras e a penetração nestas, do DNA transdutor, verificam-se através das mesmas estruturas que medeiam a infecção fágica.

Por essas razões interessa apresentar aqui um resumo do mecanismo de infecção fágica, que culmina na formação dos lisados e se costuma subdividir nas seguintes fases: adsorção, penetração, génese intracelular de fagos, maturação e lise.

1. *Adsorção fágica*

Ao serem confrontadas num mesmo meio, partículas fágicas e bactérias começam por colidir ao acaso, ao que se pode seguir uma ligação irreversível. Esta ligação é específica, dado que só as estirpes hospedeiras de um dado fago possuem os receptores (pág. 10) apropriados aos quais esse fago se pode ligar.

A *eficiência de adsorção* define-se como a razão entre o número de fagos adsorvidos e o dos inicialmente adicionados à cultura. Essa razão multiplicada por 100, exprime a eficiência de adsorção em termos de percentagem.

O estudo da eficiência de adsorção de um fago ao seu hospedeiro é particularmente importante. Como foi inicialmente salientado por STENT (1963) «é da maior importância estudar as condições de adsorção de qualquer vírus porque, dependendo das circunstâncias, é às vezes essencial obter uma rápida infecção das culturas bacterianas, enquanto que outras vezes pode ser desejável obter uma adsorção lenta e pouco eficiente».

a) Factores que afectam a adsorção

A adsorção de fagos a células que lhe são sensíveis depende do meio ambiente e do estado fisiológico da cultura.

Os factores do ambiente que têm maior importância são a composição catiónica do meio de adsorção, o seu pH, a presença de compostos orgânicos, e a temperatura.

(i) Composição catiónica do meio de cultura.

A adsorção fágica é altamente dependente da concentração da catiões mono- e divalentes no meio de cultura. Estes iões actuam, em parte, neutrali-

zando as cargas negativas da superfície bacteriana e das partículas fágicas, facilitando portanto o seu contacto inicial. Os catiões podem também ocasionar determinadas alterações nas partículas virais, alterações essas que são necessárias para que se dê a adsorção (ADAMS 1959; STENT 1963).

(ii) pH do meio de adsorção

O efeito do pH do meio na eficiência de adsorção foi investigado em vários sistemas (STENT 1963).

Verificou-se que, em geral, os fagos adsorvem entre limites afastados de pH, compreendidos entre 5 e 9, mas com um óptimo a pH 7,5.

(iii) Presença de compostos orgânicos

Os compostos orgânicos presentes no meio de adsorção podem actuar como co-factores ou antagonistas da adsorção.

Os fagos T4 e T6 requerem L-triptofano (ANDERSON 1945) como co-factor da adsorção. O triptofano reage com as fibras da cauda do fago (BRENNER *et al.* 1962; KELLENBERGER *et al.* 1965) permitindo que estas se libertem da bainha e distendam, dando-se a sua ligação aos receptores presentes na superfície bacteriana.

(iv) Temperatura

Em vários dos sistemas estudados se observou que a adsorção tem um óptimo a 37°C, mas que se verifica desde 5 a 50°C. Contudo, a temperaturas extremas o valor da eficiência de adsorção é apenas uma fracção do obtido a 37°C. O fago ϕ 80 chega a não adsorver detectavelmente a temperaturas superiores a 36°C.

(v) Estado fisiológico das bactérias hospedeiras.

DELBRÜCK (1940) foi o primeiro a demonstrar o efeito das condições fisiológicas das bactérias hospederas nas taxas de adsorção fágica. Este efeito reflecte a importância de pelo menos dois factores: dimensão celular e mobilidade. Sendo maiores, as células oferecem aos fagos uma área de adsorção mais extensa. Tendo condições metabólicas para maior mobilidade, aumentam a oportunidade de colisão entre as células e as partículas fágicas.

Além disso, a variação nas condições do meio de cultura pode originar alteração da estrutura antigénica das células e afectar portanto a capacidade de adsorção das partículas fágicas.

b) Receptores

A ligação específica das partículas fágicas à bactéria hospedeira é mediada através de certas macromoléculas presentes na superfície celular e designadas por *receptores* (Lindberg, 1973).

Os receptores estão associados não só a adsorção mas também à penetração do genoma infectante, visto que a ligação da partícula fágica com o receptor

desencadeia o processo de libertação do DNA e da sua injeção para o interior da célula.

A reacção entre a partícula fágica e o receptor é irreversível e dela resulta a inactivação do fago.

Os receptores fágicos estão relacionados com os antigénicos da parede celular (Weidel, 1951).

Diversos tipos de polímeros podem ser usados como receptores. Em bactérias gram-negativas foram identificados como receptores lipopolissacáridos, lipoproteínas e proteínas. Em bactérias gram-positivas os ácidos teicóicos, polissacáridos e proteínas são os receptores mais frequentemente encontrados.

Em vários sistemas foram identificados e isolados os receptores da parede celular responsáveis pela adsorção fágica. O fago P22, por exemplo, adsorve especificamente ao antigénio O, um polissacárido que se encontra na parede celular de *S. typhimurium* e de outras espécies de *Salmonella* (WRIGHT & KANEGASAKI 1971).

Em *B. subtilis* 168 e W23 os ácidos teicóicos da parede celular foram identificados como receptores para diferentes bacteriófagos (GLASER *et al.* 1966; YOUNG 1967).

YOUNG (1967) demonstrou que a resistência de *B. subtilis* 168 a vários fagos se encontra associada à ausência de glucose nos ácidos teicóicos da parede celular. Este autor identificou três classes de mutantes (A, B e C) com base nos seguintes critérios: tipo de crescimento em meio mínimo suplementado com galactose como única fonte de carbono, deficiência enzimática correspondente à ausência de glucosilação dos ácidos teicóicos e quantidade relativa de N-acetil-galactosamina na parede celular.

YOUNG *et al.* (1969), mapearam no cromossoma de *B. subtilis* 168 três genes *gtaA*, *gtaB* e *gtaC* responsáveis pela síntese de enzimas que intervêm na glucosilação dos ácidos teicóicos. Os mutantes *gtaA* são deficientes na enzima transferase do glucosil («glucosyl transferase»), os mutantes *gtaB* codificam um monómetro inactivo da enzima mutase do glucofosfato («phosphoglucomutase») e os mutantes *gtaC* são deficientes na enzima mutase do glucofosfato.

Tal como foi sugerido por vários autores, é de admitir no entanto a existência de outros receptores, além dos ácidos teicóicos da parede celular (YOUNG 1967; YASBIN *et al.* 1976; SHIFLETT *et al.* 1977).

Os ácidos teicóicos da membrana plasmática de *B. subtilis* também intervêm na adsorção fágica (JACOBSON & LANDMAN 1975, 1976). Como os ácidos teicóicos da membrana existem na superfície celular, ARCHIBALD (1980) sugeriu que eles pudessem constituir os receptores secundários referidos por Young e colaboradores

2. Penetração do DNA

Os resultados da experiência clássica de HERSHEY & CHASE (1952) mostraram que após a ligação irreversível de uma partícula fágica a uma bactéria hospedeira, se dá a penetração do DNA fágico na célula, permanecendo a capa proteica no exterior.

Esta observação constitui a essência do fenómeno de infecção e permitiu demonstrar que, também nos fagos, a molécula informativa é DNA [ou RNA, nos casos em que este ácido nucleico substitui o DNA (FRAENKEL-CONRAT 1956; GIERER & SCHRAMM 1956)]

O mecanismo de penetração do DNA fágico em infecção foi estudado inicialmente para os fagos T2, T4 e T6 (ANDERSON 1953; KELLENBERGER *et al.* 1965) que possuem cauda contráctil.

Os fagos com uma cauda não contráctil, requerem em geral iões divalentes, nomeadamente Ca^{++} , para que se verifique a penetração do DNA, a qual é lenta como se demonstrou para o fago T5 (LURIA & STEINER 1954). Um modelo para a penetração do DNA de λ , fago em que a cauda também não é contráctil, foi apresentado por MACKAY & BODE (1976 a, b) e poderá ser válido para outros fagos deste grupo (STEENSMA & BLOCK 1979).

Tal como se referiu para a adsorção, a composição catiónica é um factor também importante para a penetração do DNA ou RNA em diversos sistemas estudados (PARANCHYCH 1966; WATANABE & TAKESUE 1972; STEENSMA & BLOCK 1979).

3. Génese intracelular dos fagos

O estudo dos acontecimentos que se sucedem no interior da célula após a penetração do DNA fágico foi iniciado por DOERMAN (1952) para o caso do fago T4 em cujo ciclo de infecção definiu dois importantes conceitos: *período de eclipse* e *período de latência*.

Com a penetração do DNA fágico na célula inicia-se um período durante o qual se «eclipsa» a actividade infecciosa dos fagos. Durante este período, também designado «fase vegetativa», realiza-se a replicação do DNA e a síntese de proteínas específicas do fago. Tanto o DNA como as proteínas aumentam linearmente em função do tempo. O período de eclipse termina quando aparecem as primeiras partículas infecciosas, cujas existência só se pode demonstrar destruindo artificialmente o invólucro celular, visto que a bactéria só lisa espontaneamente algum tempo depois, no fim do período de latência». Este é definido como o período que medeia entre a penetração do DNA fágico e a lise da célula com libertação das partículas fágicas maduras.

4. *Maturação fágica*

Durante a fase de maturação verifica-se a condensação ou co-cristalização do DNA nas proteínas fágicas, do que resulta a formação de partículas fágicas completas. O estudo deste processo, tal como o de muitos outros aspectos da biologia dos vírus foi iniciado no fago T4 de *E. coli* (STREISINGER *et al.* 1964) mas outros sistemas foram posteriormente analisados.

É particularmente pertinente referir em pormenor o mecanismo de maturação fágica, na medida em que é durante esta fase do ciclo de infecção, que se decide a formação de partículas transdutoras.

Tal como foi inicialmente proposto por DOERMANN (1952), quando o número de moléculas de DNA e proteínas fágicas atinge dentro da célula um determinado número crítico, inicia-se a formação de partículas fágicas completas. O número de partículas fágicas aumenta linearmente em função do tempo até ao fim do período de latência, o que simultaneamente com outras linhas de evidência permitiu demonstrar que a formação de partículas fágicas depende efectivamente da associação entre vários componentes que são sintetizados separadamente, e não da replicação de uma estrutura completa.

Um dos modelos que permite explicar o processo de maturação fágica derivou de estudos genéticos e físicos dos genomas dos fagos T4 e T2 (STREISINGER *et al.* 1967). Os DNAs extraídos destes fagos são moléculas com estrutura dupla e linear, maiores que um genoma completo, e que começam e terminam com uma mesma sequência nucleotídica, designada por *redundância terminal*, que compreende 1 a 3% do genoma fágico total (STREISINGER *et al.* 1964; SÉCHAUD *et al.* 1965; MACHATTIE *et al.* 1967). Por outro lado, os genomas de uma dada população de fagos T4 e T2 não são todos idênticos mas sim *permutações circulares* uns dos outros.

As extremidades redundantes não são fixas e podem derivar de qualquer região do genoma ao acaso. Verificou-se também que os mapas genéticos de T4 e T2 são circulares (STREISINGER & BRUCE 1960; FOSS & STAHL 1963; STREISINGER *et al.* 1964; THOMAS & MACHATTIE 1964).

A observação de que a quantidade de DNA existente numa partícula fágica madura é maior que um genoma completo levou STREISINGER *et al.* (1964) a sugerir que na replicação do DNA de T4 se formaria uma molécula intermediária significativamente maior que um genoma completo, *molécula conca-tomérica* esta que seria cortada em fragmentos maiores do que um genoma completo, que seriam incluídos nas partículas fágicas maduras. FRANKEL (1966a, b) obteve evidência experimental de que efectivamente a replicação do DNA do fago T4 passa pela forma de um longo polímero.

Os vários factos aqui resumidos foram relacionados por STREISINGER *et al.* (1967) num modelo de maturação que ficou conhecido como o «modelo de Streisinger».

Segundo ele, o comprimento médio da molécula de DNA contido numa partícula fágica de T4 não é determinado por um factor intrínseco do genoma como se observa no fago λ , mas por um factor extrínseco, nomeadamente a quantidade de DNA que pode ser incluída na partícula. O comprimento médio do DNA fágico corresponde portanto à capacidade máxima da cabeça fágica. Se o comprimento do genoma for menor que a quantidade de DNA que pode ser incluída na partícula, o DNA fágico terá uma repetição terminal. Como as várias moléculas que são incluídas nas cabeças são cortadas ao longo de uma molécula concatomérica, a sequência inicial e a terminal serão idênticas («redundância terminal»).

Como consequência teórica deste modelo, mutantes que apresentam longas deleções do genoma, deverão ver aumentada, em relação ao tipo selvagem, a sua região de redundância terminal, mas sem alteração da densidade das partículas. STREISINGER *et al.* (1967) mostraram que isso de facto se verifica com o fago T4.

Este modelo não especifica o modo como se inicia a condensação do DNA às proteínas fágicas, mas são possíveis pelo menos duas variantes principais. Se a encapsulação do DNA começar a partir de pontos distribuídos ao acaso ao longo da molécula obtêm-se DNAs fágicos em que as extremidades repetitivas podem corresponder a qualquer zona do genoma (*permutação ao acaso*). É o caso dos DNAs de T4 e T2 (STREISINGER *et al.* 1964). Se, pelo contrário, a encapsulação se iniciar a partir de um ponto fixo da molécula concatomérica, e prosseguir sequencialmente, obtém-se uma distribuição restrita das extremidades (*permutação restrita*).

O fago P222 é o sistema em que existe permutação restrita melhor estudado. RHOADES *et al.* (1968) mostraram que o DNA deste fago apresenta permutação circular e extremidades repetitivas. TYE *et al.* (1974 a, b) e YOUNG *et al.* (1974) verificaram que a permutação circular do DNA de P22 é restrita; as extremidades repetitivas correspondem apenas a cerca de 2% do genoma. Segundo estes autores a encapsulação do DNA de P22 inicia-se num ponto fixo da molécula concatomérica precursora, a partir do qual prossegue sequencial e unidireccionalmente. Como o DNA de P22 tem uma repetição terminal que corresponde a 2% do comprimento do genoma, se a molécula concatomérica for 10 vezes maior que o DNA maduro, origina-se por este processo uma população de moléculas com uma permutação circular de 20%.

Quanto à natureza e localização do ponto único em que se inicia a encapsulação do DNA de P22 foi proposto por TYE (1976) que o produto do gene 3 do fago (denominado p3) se ligaria especificamente a um determinado local da molécula concatomérica. Para se iniciar o processo de encapsulação dar-se-ia o corte desta molécula. O produto p3 poderia deslizar ao longo do DNA até se completar a co-cristalização entre as proteínas e o DNA de uma partí-

cula, cortando a molécula e ligando-se depois a uma nova extremidade da molécula concatomérica, para se iniciar a formação de nova partícula. Todos os acontecimentos do mecanismo de encapsulação seriam semelhantes, por se iniciarem pela ligação do produto p3 à molécula concatomérica. O local na molécula concatomérica onde se inicia o processo de encapsulação foi designado por *pac*, localiza-se perto do gene 3 (WEAVER & LEVINE 1978) e não coincide com a origem de replicação do DNA de P22 HILLIKER & BOTSTEIN 1976).

5. *Génese das partículas transdutoras*

IKEDA & TOMIZAWA (1965c) e RHOADES *et al.* (1968) foram os primeiros autores a considerarem a relação entre o mecanismo de maturação do DNA de um dado fago e a sua capacidade de efectuar transdução generalizada.

As moléculas de DNA de alguns fagos não contêm terminações fixas e apresentam permutações de sequências, podendo a co-cristalização entre as proteínas e o DNA fágico iniciar-se em qualquer ponto ao longo da molécula concatomérica.

Noutros fagos, como por exemplo λ , ϕ 80 e T5, os genomas apresentam terminações fixas com todas as consequências que tal facto implica (pág. ?; KAISER 1962; HERTEL *et al.* 1962; PARKINSON & HUSKEY 1971).

Contrariamente ao que sucede com os fagos do primeiro grupo, os do segundo não são capazes de realizar transdução generalizada, visto que o DNA bacteriano não possui as terminações fixas necessárias para que se inicie o processo de encapsulação. Mas quando o DNA bacteriano se encontrar integrado no genoma fágico pode ser incluído nas partículas fágicas mediando transdução especializada.

Verificou-se efectivamente que os fagos que efectuam transdução generalizada como P22 e P1 se multiplicam por um mecanismo basicamente semelhante ao de T4. Os fagos temperados em que a molécula de DNA não apresenta extremidades fixas podem mediar transdução generalizada ou especializada pelo mecanismo atrás descrito (pág. ?).

Quando no interior de uma célula de *S. typhimurium* infectada por P22 se inicia o processo de maturação fágica, as quantidades de DNA bacteriano e fágico presentes são aproximadamente iguais. No entanto a percentagem do DNA de *Salmonella* incluído nas partículas transdutoras representa apenas 1 a 5% do DNA bacteriano total (EBEL-TSIPIS *et al.* 1972a) enquanto cerca de 50% do DNA fágico intracelular é encapsulado nas partículas fágicas (BOTSTEIN 1968). Conclusões semelhantes a estas foram obtidas no sistema *E. coli* — P1 em que o número de partículas transdutoras é de apenas 0,3% do número total de partículas fágicas (IKEDA & TOMIZAWA 1965a).

Estas observações permitiram sugerir a existência de um mecanismo preferencial de encapsulação do DNA fágico (EBEL-TSIPIS *et al.* 1972a). Embora o processo pelo qual se formam as partículas transdutoras e fágicas seja basicamente idêntico, deve haver um mecanismo específico que discrimine entre o DNA fágico e bacteriano, fazendo que o primeiro seja preferencialmente usado como substrato da encapsulação.

CHELALA & MARGOLIN (1974) avançaram a hipótese de que a co-cristalização entre o DNA bacteriano e as proteínas fágicas se daria a partir de determinados pontos de iniciação no cromossoma dador, prosseguindo depois sequencialmente. A razão pela qual o DNA fágico seria preferencialmente usado como substrato residiria na existência de um número de locais de iniciação maior no DNA de P22 do que no genoma bacteriano. Este modelo é sustentado por duas principais linhas de evidência. CHELALA & MARGOLIN (1974) verificaram que a deleção de genes perto de um par de marcas ligadas do cromossoma bacteriano pode afectar as percentagens de co-transdução de marcas ligadas, o que sugere a ocorrência de pontos de iniciação preferenciais do processo de encapsulação. Em segundo lugar, a observação de que as diferentes marcas do cromossoma bacteriano são transduzidas com frequências diferentes (ZINDER 1955; SCHMIEGER 1972) apoia este conceito, e embora a natureza dos pontos preferenciais de iniciação não seja conhecida, deveriam corresponder à especificidade apresentada pela iniciação preferencial da encapsulação do DNA fágico.

A existência de um mecanismo comum responsável pela encapsulação do DNA fágico e bacteriano parece ser demonstrado pelo trabalho, iniciado por SCHMIEGER (1971, 1972), sobre mutantes de P22 com actividade transdutora alterada. Este autor isolou duas classes de mutantes: uns (HT) que transduzem com uma eficiência muito maior, e outros (NT) que transduzem com uma eficiência muito menor que o tipo selvagem.

O estudo dos mutantes HT revelou que, pelos menos alguns deles, têm uma mutação no gene 3 (RAJ *et al.* 1974) o qual, como se referiu (pág. ?), parece estar envolvido na iniciação do processo de encapsulação do DNA de P22 (BOTSTEIN *et al.* 1973). Nos mutantes HT a quantidade de DNA bacteriano incluído nas partículas é muito maior do que no tipo selvagem, existindo portanto, uma percentagem de partículas transdutoras mais elevada que nos lisados de tipo selvagem (SCHMIEGER 1972). Além disso, as partículas transdutoras dos lisados de tipo selvagem transduzem a diferentes marcas com eficiências desiguais (ZINDER 1955; SCHMIEGER 1972) enquanto as partículas transdutoras dos lisados HT transduzem as mesmas marcas com uma eficiência constante e elevada. Observou-se, também, que as frequências de co-transdução de marcas ligadas obtidas com os mutantes HT são diferentes das obtidas com o fago de tipo selvagem. Estas observações permitiram formular a

hipótese da alteração, nestes mutantes, do mecanismo de encapsulação (SCHMIEGER & BACKAUS 1976).

TYE (1976) demonstrou que o DNA dos mutantes HT apresenta permutação ao acaso enquanto o do tipo selvagem revela permutação restrita. Essa alteração da especificidade do produto do gene 3 permitiria ao DNA bacteriano ser usado com eficiência igual à do DNA fágico como substrato do processo de maturação, o que explica número muito mais elevado de partículas transdutoras formadas nos lisados HT. Por outro lado como, nesses mutantes, a co-cristalização do DNA e das proteínas não se inicia apenas por determinadas sequências; qualquer segmento de DNA bacteriano tem igual probabilidade de ser incluído numa cabeça fágica, de que resultam a idêntica frequência de transdução de diferentes marcas e a diferença nas percentagens de co-transdução em relação ao tipo selvagem.

Em conclusão, toda a evidência experimental obtida pelo estudo do sistema de *S. typhimurium* — P22 parece apoiar o modelo que propõe um mesmo mecanismo como responsável pela formação de partículas transdutoras e fágicas.

6. Lise

No fim do período de latência verifica-se a lise da célula infectada, com libertação de dezenas ou centenas de fagos resultantes do ciclo de infecção.

A lise da célula resulta da síntese e actividade de enzimas que degradam a parede celular, e não de uma distensão da superfície celular. Foram isolados por exemplo mutantes do fago λ , designados por S^- , que não lisam as células. Acumula-se neste caso um número de fagos no interior das células muito mais elevado do que no tipo selvagem (ECHOLS & MURIALDO 1978).

Em alguns sistemas foi identificada a enzima, codificada pelo fago e responsável pela lise da respectiva célula hospedeira (HOCH & DRYER 1958; ZINDER & LYONS 1968). Foram também isolados mutantes dos fagos T4 e λ , que conduzem normalmente todo o processo de infecção fágica mas que são incapazes de desencadear a lise da célula, visto não sintetizarem a respectiva enzima (STREISINGER *et al.* 1961, JACOB & FUEEST 1958).

4. MECANISMO MOLECULAR DA TRANSDUÇÃO GENERALIZADA

1. Destino do DNA transdutor

As partículas transdutoras, tal como as partículas fágicas, depois de adsorverem às células da cultura receptora injectam nelas o seu DNA. O DNA transdutor pode então seguir um de quatro destinos distintos: integrar-se no

cromossoma bacteriano por substituição; integrar-se por adição; persistir na célula sem se replicar, mas podendo expressar-se (*transdução abortiva*); ser logo degradado por endonucleases específicas.

Consideraremos, sumariamente, estes quatro processos:

a) Transdução por substituição

Este fenómeno verifica-se tanto em transdução generalizada como especializada. O DNA transdutor integra-se no cromossoma receptor por recombinação, substituindo os alelos correspondentes do genoma do hospedeiro. Para que se verifique esta substituição é necessário um número par de entrecruzamentos, entre dador e receptor.

A transdução por substituição não se verifica em células de *E. coli* Rec⁻ (deficientes nas enzimas de recombinação) onde apenas se observa transdução abortiva (OZEKI & IKEDA 1968).

Nos sistemas de transdução generalizada apenas cerca de 10% do DNA transdutor é integrado por substituição, enquanto que o restante origina transdução abortiva (OZEKI 1959; STOCKER 1956; GROSS & ENGLERBERG 1959; EBEL-TSIPIS *et al.* 1972a; SANDRI & BERGER 1980a).

A irradiação, com ultravioletas, de lisados transdutores permite aumentar a frequência de transdução por substituição (possivelmente por aumentar as oportunidades de recombinação) e diminuir a frequência de transdução abortiva (GAREN & ZINDER 1955; ARBER 1960; LURIA *et al.* 1960; BENZINGER & HARTMAN 1962).

b) Transdução por adição

O DNA transdutor integra-se no cromossoma por um mecanismo idêntico ao da lisogenação. Este processo ocorre tipicamente em transdução especializada.

c) Transdução abortiva

A transdução abortiva caracteriza-se pela transferência unilinear do DNA transdutor. Neste caso o DNA transdutor expressa-se no hospedeiro, mas não se integra e, por isso, não se replica (LEDERBERG 1956).

Assim, em cada ciclo de divisões celulares só uma célula herda esse DNA transdutor, e, conseqüentemente, só existe uma molécula desse DNA dador

por cada colónia transduzida. Os transdutantes apresentam-se, por isso, excepcionalmente pequenos (CAMPBELL 1964).

A transdução abortiva ocorre tanto em transdução generalizada como especializada e a sua frequência é superior à das outras transduções.

A ocorrência de transdução abortiva nos dois sistemas de transdução generalizada melhor estudados (P22 e P1) foi inicialmente demonstrada por métodos genéticos (GROSS & ENGLERBERG 1959; OZEKI 1959).

O estudo do destino intracelular do DNA transdutor, por métodos físicos, no sistema P22 — *S. typhimurium* permitiu confirmar que a maior parte (85 a 90%) do DNA transdutor que penetra nas células persiste no seu interior em estrutura dupla e sem se integrar nem replicar, e é responsável pela transdução abortiva (EBEL-TSIPIS *et al.* 1972b).

SANDRI & BERGER (1980a), usando uma técnica semelhante, demonstraram que também na transdução mediada pelo fago P1, uma elevada percentagem do DNA transdutor, que penetra nas células da cultura receptora, permanece sem se integrar no cromossoma. Este DNA transduzido abortivamente por P22 ou P1, permanece sem se replicar até pelo menos 5 horas depois da adsorção (EBEL-TSIPIS *et al.* 1972b e SANDRI & BERGER 1980a).

IKEDA & TOMIZAWA (1965b) verificaram que o DNA transdutor extraído de partículas transdutoras do fago P1 se encontra associado a uma molécula proteica de aproximadamente 5×10^5 daitons. SANDRI & BERGER (1980b) propuseram um modelo segundo o qual o DNA transduzido abortivamente adquiriria uma estrutura circular após penetração nas células, por meio da proteína a que está associado, tornando-se deste modo resistente à acção de nucleases.

d) Degradação do DNA transdutor

A rápida degradação do DNA transdutor apenas se verifica em certas combinações de estirpes dadores e receptoras, em consequência do mecanismo de restrição e modificação controlada pelo hospedeiro (ARBER 1965, 1974).

As estirpes R de *B. subtilis* sintetizam a enzima de restrição designada por endo R. *Bsu* R (TRAUTNER *et al.* 1974; BRON *et al.* 1975; BRON & MURRAY 195). Se culturas destas estirpes $r^+ m^+$ (com actividade restritiva e modificativa) forem usadas como receptoras em transdução, verifica-se a degradação do DNA transdutor, se as estirpes bacterianas dadoras forem $r^- m^-$ (sem actividade restritiva e modificativa). Verificou-se este facto tanto para a transdução mediada por PBS1 (TRAUTNER *et al.* 1974) como por SPP1 (FERRARI *et al.* 1978).

2. Mecanismo de integração do DNA transdutor

O estudo do destino do DNA transdutor após penetração nas células receptoras, foi iniciado por EBEL-TSIPIS *et al.* (1972b), usando métodos físicos, no sistema P22 — *S. typhimurium*

Como as partículas transdutoras de P22 incluem fundamentalmente DNA bacteriano sintetizado antes da infecção, é possível obter preparações puras de partículas transdutoras, marcadas com isótopos de densidade e de radioactividade.

Assim, partículas transdutoras purificadas, marcadas com ^{15}N , ^{13}C e ^3H foram usadas para infectar em meio leve e não radioactivo culturas de *S. typhimurium* pré-incubadas em meio com ^{32}P . A diferentes tempos após a infecção, retiraram-se amostras das culturas e extraíu-se o seu DNA, que foi equilibrado em gradientes de CsCl .

Como atrás se referia, 85 a 90% do DNA transdutor que penetra nas células persiste no seu interior em estrutura dupla e sem se integrar. Dos restantes 10 a 15% do DNA transdutor, que aparecem fisicamente associados com o DNA da bactéria receptora, apenas 1:3 a 1:5 se integra em fragmentos de peso molecular da ordem de 4 a 8×10^4 daltons.

Os dados obtidos permitiram concluir que esta integração se dá em cadeia dupla em contraste com o que se passa em transformação, em que a integração é em cadeia simples (LACKS, 1977).

Esta diferença pode ser consequência do diferente modo de penetração na célula dos DNAs transdutor e transformante.

Recentemente, SANDRI & BERGER (1980a), utilizando metodologia semelhante à anterior, analisaram o destino do DNA transdutor no sistema P1 — *E. coli*.

Estes autores verificaram que apenas 7 a 15% do DNA transdutor que penetra nas células se integra no genoma receptor; a maior parte do DNA transdutor não se integra, sendo responsável pela transdução abortiva que atrás se mencionou.

Contudo, do DNA transdutor que aparece covalentemente associado com o DNA receptor, apenas 9 a 15% se encontra como DNA recombinante em fragmentos de estrutura dupla e com um peso molecular de $5-10 \times 10^6$ daltons (SANDRI & BERGER 1980a). Como o peso molecular do DNA extraído de partículas purificadas é de 6×10^7 daltons (IKEDA & TOMIZAWA 1965a) conclui-se que há uma considerável redução nas dimensões dos fragmentos do DNA transdutor que se integram no cromossoma em relação ao do DNA transdutor intacto.

A maior parte do DNA transdutor que se integra no genoma receptor não representa DNA recombinante, e a sua associação com o genoma receptor

deve resultar de uma re-utilização de nucleótidos do DNA transdutor (SANDRI & BERGER 1980a).

O mecanismo explicativo da integração do DNA transdutor em cadeia dupla não está pormenorizado. O único modelo compatível com os dados genéticos e físicos é o de que a recombinação se dê por um mecanismo de recombinação que envolva dois (ou outro número par) de entrecruzamentos entre o dador e o receptor (EBEL-TSIPIS *et al.* 1972b).

TRANSDUÇÃO GENERALIZADA EM *B. SUBTILIS*. FAGOS TRANSDUTORES

1. SP10 e SP20

SP10 foi o primeiro fago de *B. subtilis* que se constatou ser capaz de efectuar transdução generalizada (THORNE 1962). O fago SP20, que é semelhante a SP10, também medeia o mesmo tipo de transdução (GWINN & LAWTON 1968).

Os fagos SP10 e SP20 multiplicam-se nas estirpes de *B. subtilis* derivadas da estirpe W23, mas não nas isogénicas de 168, embora sejam capazes de adsorver a estas últimas. Ambos os fagos efectuem transdução homóloga, entre estirpes de W23, e transdução heteróloga entre W23 (dador) e 168 (receptor) (THORNE 1962; GWINN & LAWTON 1968).

O facto de *B. subtilis* 168 não permitir a multiplicação de SP10 limita um pouco o interesse deste fago como vector de transdução, visto que as estirpes derivadas de *B. subtilis* são as melhor conhecidas geneticamente, devido principalmente a serem transformáveis, enquanto *B. subtilis* W23 o não é (HEMPHILL & WHITELEY 1975).

É contudo possível obter multiplicação de SP10 e SP20 em *B. subtilis* 168, submetendo as culturas a um regime especial de incubação a 53°C, por 10 min, e infectando-as em seguida com os fagos a 37°C. Nestas condições obtém-se infecção completa. O mecanismo restritivo destes fagos em *B. subtilis* 168 é portanto sensível à temperatura. O factor que causa a restrição pode ser uma nuclease e ou um repressor codificado por um profago residente (por exemplo PBSX ou SP β) (GOLDBERG & BRYAN 1968).

O método descrito para a multiplicação de SP10 em *B. subtilis* 168 tem sido contudo pouco usado, e por isso os trabalhos de mapeamento genético desta estirpe com SP10 têm sido feitos com lisados preparados em *B. subtilis* W23.

Recentemente YAJIMA *et al.* (1979) isolaram uma estirpe mutante de *B. subtilis* 168 que é permissiva para o fago SP10. SAITO *et al.* (1979) mapea-

ram, nesta estirpe, dois genes, *nonA* e *nonB*, cuja presença simultânea, na forma alélica mutante, é necessária para a permissibilidade de *B. subtilis* 168 à infecção por SP10. Segundo YAJIMA *et al.* (1979) a ausência de multiplicação fágica, nas estirpes de tipo selvagem para um destes genes (*nonA*⁺ e *nonB*⁺), é devida a uma incompleta transcrição do genoma de SP10.

O fago SP10 multiplica-se também em *B. licheniformis* 9945A (THORNE 1962) e é capaz de transdução generalizada nesta espécie (TAYLOR & THORNE 1963) Todavia não foi possível obter transdução interespecifica entre *B. subtilis* W23 e *B. licheniformis* ou vice-versa, devido possivelmente à falta de homologia entre os DNAs destas duas espécies (TAYLOR & THORNE 1963).

A transdução génica mediada por SP10 tem as características essenciais (THORNE 1961; 1962) do fenómeno de transdução generalizada (ZINDER & LEDERBERG 1952; ZINDER 1953).

OKUBO *et al.* (1963) verificaram que o DNA contido nas partículas transdutoras dos lisados de SP10 é de origem exclusivamente bacteriana. Estes autores, por equilíbrio em gradientes contínuos de CsCl, observaram uma diferença de densidade entre as partículas fágicas e as partículas transdutoras (menos densas); essa diferença é contudo, demasiado pequena para permitir obter preparações puras das partículas transdutoras. Assim, os estudos subsequentes sobre a natureza do DNA transdutor foram feitos com o DNA total extraído dos lisados. Verificou-se que ele é activo em transformação, e que se dá a perda desta actividade biológica, se for submetido a temperaturas que causam a desnaturação do DNA de *B. subtilis*.

No entanto, se for submetido a temperaturas que causem apenas a desnaturação do DNA de SP10, não há perda da actividade transformadora. Estes resultados permitiram concluir que a actividade biológica (em transformação) dos lisados de SP10 está associada à presença de DNA bacteriano.

Para determinar se o DNA bacteriano, nas partículas transdutoras, se encontra covalentemente ligado a DNA fágico, centrifugou-se, em gradiente de Cs₂SO₄, o DNA extraído de lisados de SP10 (preparados numa estirpe Trp⁺) simultaneamente com DNA de *B. subtilis* Trp⁻. Obtiveram-se duas bandas: uma, de maior densidade, correspondente ao DNA de SP10 e sem actividade em transformação; e outra, correspondente ao DNA de *B. subtilis* e com actividade transformadora Trp⁺. Pela separação entre as duas bandas foi possível calcular que as partículas transdutoras contêm essencialmente DNA bacteriano; a incluírem DNA fágico a quantidade deste seria inferior a 4%.

TYERYAR *et al.* (1969) demonstraram que em *B. licheniformis* a frequência de co-transformação de marcas ligadas é muito menor que a frequência de co-transdução pelo fago SP10. Estes resultados permitiram concluir que

o fago SP10 transporta fragmentos de DNA de dimensões maiores que os do DNA que efectua transformação.

EPHRATI-ELIZUR & FOX (1961) usaram DNA extraído de *B. subtilis* W23 e lisados de SP10 preparados nesta estirpe para, respectivamente, transformar e transduzir *B. subtilis* 168. Verificaram que as frequências de co-transfêrência de marcas ligadas pelos dois mecanismos são semelhantes.

Esta diferença nos resultados dos dois grupos de investigadores é interpretada por DUBNAU *et al.* (1969) e YOUNG & WILSON (1972), como sendo devida a que, em condições de transferência génica entre estirpes heterólogas (W23 e 168), a transdução é mais afectada do que a transformação.

O fago SP10 tem sido usado para o mapeamento fino dos genomas de *B. subtilis* W23 e 168, e no estudo da transdução homóloga e heteróloga (CANOSI *et al.* 1979). Estes autores mostraram que o mecanismo da transdução heteróloga, mediada por SP10 ou PBS1, é sensível ao 6-(p-hidroxifenilazo)-uracilo (HPUra), tal como a transformação. A transdução homóloga é pelo contrário resistente ao HPUra, o que sugere que o mecanismo de transdução heteróloga é, pelo menos parcialmente, diferente do da transdução homóloga. A enzima DNA polimerase III poderá estar envolvida no(s) mecanismo(s) de recombinação que actua em transformação e na transdução heteróloga enquanto que a transdução homóloga parece seguir uma via parcialmente independente não envolvendo aquela enzima.

2. PBS1 e PBS2

Pouco tempo depois de THORNE (1961) ter descrito a transdução generalizada mediada por SP10 em *B. subtilis*, TAKAHASHI (1962) demonstrou que o fago PBS1 também efectua transdução.

Este fago multiplica-se em estirpes de *B. subtilis* tanto derivadas de 168 como de W23 (TAKAHASHI 1961; TAKAHASHI 1963) e tem a capacidade de transduzir marcas de prototrofia ou auxotrofia, de resistência a antibióticos, de esporulação, de utilização de açúcares, etc.

TAKAHASHI (1963) estudou também a transferência génica efectuada por um mutante de placas homogêneas («clear») de PBS1 que designou por PBS2; este mutante também realiza transdução generalizada, mas a frequência de transdução é mais baixa que a mediada por PBS1.

Os fagos PBS1 e PBS2 só adsorvem a células de *B. subtilis* dotadas de grande mobilidade e não infectam mutantes desprovidos de flagelos (JOYS 1965; FRANKEL & JOYS 1966).

RAIMONDO *et al.* (1968) demonstraram que os receptores para a adsorção se encontram nos flagelos. As partículas fágicas ligam-se aos flagelos

(activos ou inactivos) enrolando as fibras da cauda em torno do filamento do flagelo. Esta ligação é contudo reversível (RAIMONDO *et al.* 1968) e não é específica para os flagelos de bactérias sensíveis a PBS1 (WILSON & TAKAHASHI 1978). Os fagos movem-se (ou são arrastados pelo movimento de rotação do flagelo) em direcção à base do flagelo (necessariamente activo) à qual se ligam irreversivelmente; a esta ligação segue-se a contracção da cauda do fago e a libertação e penetração do ácido nucleico (WILSON & TAKAHASHI 1978). Os componentes da parede celular de *B. subtilis* parecem não ser necessários para a adsorção de PBS1, visto que este fago é capaz de adsorver a protoplastos (RAIMONDO *et al.* 1968).

Embora o fago PBS1 cause infecção completa de *B. subtilis*, a lise é muitas vezes irregular e o título dos lisados muito variável. LOVETT & YOUNG (1970, 1971) publicaram um método em que o PBS1 cresce inicialmente em *B. pumilus*, o lisado resultante infecta o dador pretendido (*B. subtilis*), e esse lisado transdutor é finalmente adicionado à cultura receptora. Outros autores (HOCH *et al.* 1967; COPELAND & MARMUR 1968; JAMET & ANAGNOSTOPOULOS 1969; KARAMATA & GROSS 1970; DUBNAU 1971) adoptaram métodos menos complexos para preparar lisados transdutores, essencialmente derivados do método originalmente descrito por TAKAHASHI (1963).

O fago PBS1 pode adsorver a *B. licheniformis* 9945A embora não termine infecção nesta bactéria (TYERYAR *et al.* 1969). Não foi possível demonstrar a ocorrência de transdução interespecífica, provavelmente à insuficiente homologia entre o DNA dos dadores potenciais (*B. subtilis* W23 ou 168) e do receptor (*B. licheniformis*).

Verificou-se que o fago PBS1 é capaz de infectar e transduzir algumas estirpes de *B. pumilus* (LOVETT & YOUNG, 1970; LOVETT, 1972). Comparando 32 estirpes de *B. pumilus* em relação à sua capacidade de permitir a multiplicação de PBS1 e de PBP1 [fago que adsorve especificamente a flagelos e é capaz de transdução generalizada em *B. pumilus* (LOVETT, 1972)] verificou-se que estes se podem dividir em três grupos: um é sensível tanto a PBS1 como a PBP1; outro é somente sensível a PBP1; e o terceiro é resistente a ambos os fagos.

Em condições óptimas, o fago PBS1 transporta grandes fragmentos do DNA dador, que se calculou corresponderem a 5-10% do genoma de *B. subtilis* (YOUNG & WILSON 1972; HENNER & HOCH 1980).

Como em *B. subtilis* não existe conjugação, a transdução mediada pelo fago PBS1 tem sido o principal método utilizado para o mapeamento grosseiro do genoma. Deste modo se estabeleceu a ligação entre grandes grupos de marcas genéticas e se demonstrou que o cromossoma de *B. subtilis* é circular (LEPESANT-KEJZLAROVÁ *et al.* 1975). Recentemente, HENNER & HOCH (1980) publicaram um mapa genético, fisicamente calibrado, do cromossoma

de *B. subtilis* baseado em dados de frequências de co-transdução obtidos com PBS1.

É possível obter transdução heteróloga entre *B. subtilis* W23 e 168, usando PBS1. Contudo, o nível de heterotransdução é mais baixo com PBS1 do que com SP10. É possível que exista um mecanismo que discrimine contra grandes fragmentos de DNA heterólogo, devido à ausência de homologia entre as seqüências de bases do DNA dador e receptor. A frequência de transdução heteróloga obtida com SP10 é intermédia entre a observada com PBS1 e a obtida em transformação heteróloga.

A análise do DNA transdutor neste sistema foi iniciado por MAHLER *et al.* (1964) que isolaram DNA de lisados purificados do fago PBS2 e equilibraram este DNA em gradientes de CsCl. Verificaram que o DNA aparecia em duas bandas, uma com a densidade do DNA de PBS2 ($1,723 \text{ grs cm}^{-3}$) e outra com a densidade do DNA de *B. subtilis* ($1,703 \text{ grs cm}^{-3}$). Estudaram a actividade biológica dos dois DNAs em transformação e verificaram que esta estava exclusivamente associada ao DNA de menor densidade.

Porque também o DNA de PBS1 tem densidade diferente da do cromossoma de *B. subtilis* YAMAGISHI & TAKAHASHI (1968) centrifugaram lisados de PBS1 em gradientes de cloreto de céσιο e separaram as partículas infecciosas das transdutoras. Extraíram o DNA destas últimas e verificaram que ele é exclusivamente bacteriano.

3. 3NT e I10

Estes fagos têm sido muito menos estudados que os anteriormente referidos. O fago 3NT foi isolado e descrito por CSISZAR & IVANOVICS (1964), que o caracterizaram como capaz de realizar transdução generalizada em *B. subtilis*. O fago I10 foi estudado pela primeira vez por RIMA & STEENSMA (1971).

Estes dois fagos são muito semelhantes a PBS1 no que respeita às características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e serológicas (RIMA & VAN KLEEFF 1971). Estes autores mostraram que PBS1, 3NT e I10 formam placas em *B. subtilis* W23 e não em *B. subtilis* 168. Todavia tem sido repetidamente observado por outros autores que o fago PBS1 é capaz de infectar *B. subtilis* 168, com produção de placas.

A transdução generalizada mediada pelos três fagos foi estudada entre *B. subtilis* W23 e *B. subtilis* 168 (RIMA & VAN KLEEFF 1971).

4. AR9

É este um dos fagos de *B. subtilis* de maiores dimensões e complexidade morfológica (BELYAEVA & AZIZBEKYAN 1968). Estruturalmente, é semelhante a PBS1 e deve pertencer ao mesmo grupo, sendo cerca de 1,25 vezes maior que PBS1.

Infecta *B. subtilis* W23 e 168 com formação de placas e é capaz de realizar transdução generalizada.

Este fago tem sido muito pouco estudado em si próprio e apenas usado por um pequeno número de autores, como vector em transdução generalizada (LOVE *et al.* 1976; GRYCZAN *et al.* 1978).

5 SP15

O fago SP15 foi isolado por TAYLOR & THORNE (1963) que demonstraram que ele é capaz de infectar e transduzir *B. subtilis* W23 e *B. licheniformis* 9945A. Tem sido menos utilizado que os fagos PBS1 e SP10 visto não infectar nem transduzir *B. subtilis* 168 (TAYLOR & THORNE 1963).

O fago SP15, tal como PBS1, não adsorve a mutantes sem flagelos (TYERYAR *et al.* 1969).

TYERYAR *et al.* (1969) demonstraram que as marcas co-transdutíveis em *B. subtilis* W23 se encontram mais ligadas pela transdução mediada por SP15 do que por PBS1. Concluíram, portanto, que as partículas transdutoras de SP15 transportam um fragmento maior do cromossoma bacteriano que as partículas transdutoras de PBS1.

Os pesos moleculares dos DNAs de SP15 e PBS1 são respectivamente $2,5 \times 10^8$ (TYERYAR *et al.* 1969) e $1,9 \times 10^8$ (HUNTER *et al.* 1967) ou $1,7 \times 10^8$ (TYERYAR *et al.* 1969).

6. SPPI, 41c, 22a, ρ 15 e SF6

YASBIN & YOUNG (1974) mostraram que lisados do fago SPPI (RIVA *et al.* 1968) são capazes de mediar transdução generalizada entre estirpes derivadas de *B. subtilis* 168 que é o hospedeiro habitual deste fago (HEMPHILL & WHITELEY 1975). A caracterização aprofundada do sistema SPPI — *B. subtilis* foi efectuada usando aproximações diferentes por FERRARI *et al.* (1978) e LENCASTRE & ARCHER (1979, 1980, 1981). Foi posteriormente verificado que outros fagos estreitamente relacionados com SPPI (41c, 22a, ρ 15 e SF6) também medeiam transdução generalizada (SANTOS *et al.* 1984).

Por análise de co-transferência entre diferentes pares de marcas genéticas concluiu-se que aproximadamente 1% do cromossoma bacteriano pode ser mobilizado por transdução mediada pelos fagos deste grupo (YASBIN & YOUNG 1978; SANTOS *et al.* 1984). Este facto torna os sistemas de transdução associados a estes fagos potencialmente úteis para o mapeamento fino do genoma de *B. subtilis*.

OCORRÊNCIA GERAL DO FENÓMENO

ZINDER & LEDERBERG (1952) iniciaram o estudo do fenómeno de transdução generalizada mediada pelo fago temperado P22 em *S. typhimurium*. Este sistema tem sido continuamente estudado por diferentes grupos de investigadores, sendo o sistema de transdução generalizada mais profundamente analisado. O fago P22 também é capaz de mediar transdução especializada (SMITH-KEARY 1966). Em *S. typhimurium*, há outros fagos, como por exemplo o fago temperado KB2, que medeiam transdução generalizada (BORO & BRENCHLEY 1971; MCINTIRE 1974).

A existência de transdução foi verificada posteriormente em muitas espécies de bactérias e a sua ocorrência poderá ser tão geral como a dos próprios fagos. Tem-se encontrado transdução em bactérias do solo, de sedimentos, de águas doces, marinhas e salobras. Admite-se assim que a transdução possa ser o mecanismo de transferência génica mais comum em bactérias (MORRISON *et al.* 1978).

Alguns dos sistemas em que se verificou ocorrer transdução são referidos nas alíneas seguintes.

a) *E. coli*

Em *E. coli* observa-se transdução generalizada mediada pelos fagos P1 (LENOX 1955; CARO & BERG 1971), 363 (JACOB 1955), e T1 (DREXLER & KYLBERG 1975). Recentemente, WILSON *et al.* (1979) demonstraram que um mutante múltiplo do fago virulento T4 é capaz de efectuar transdução generalizada.

Também se verifica transdução especializada em *E. coli*, mediada pelos fagos λ (MORSE 1954), $\phi 80$ (MATSUSHIRO 1963), 82, 363 e 434 (JACOB 1955), P1 (LURIA *et al.* 1960), $\phi 170$ (OZEKI & IKEDA 1968) e $\phi \gamma$ (GRATIA 1973).

b) *Shigella*

Em *S. dysenteriae* há transdução generalizada mediada pelo fago P1 (LENNOX 1955; ADAMS & LURIA 1958) e também transdução especializada mediada por P1 (LURIA *et al.* 1960).

c) *Pseudomonas*

O número de fagos isolados em pelos menos duas espécies deste género (*P. aeruginosa* e *P. putida*) é elevado e verificou-se que alguns são capazes de mediar transdução.

Em *P. aeruginosa* ocorre transdução generalizada mediada por vários fagos temperados, tendo sido cinco estudados em maior pormenor: B110 (HOLLOWAY & MONK 1959), B3 (HOLLOWAY *et al.* 1962), F116 (HOLLOWAY & FARGIE 1960; HOLLOWAY *et al.* 1962; MILLER *et al.* 1974 1977; MORRISON *et al.* 1978), B (LOUTIT 1958, 1959; PEARCE & LOUITIT 1965), e G101 (HOLLOWAY 1969; MILLER *et al.* 1974).

Em *P. putida* conhecem-se pelos menos dois fagos capazes de efectuar transdução generalizada: pf16 (CHAKRABARTY *et al.* 1968; CHAKRABARTY & GUNSALUS 1969; HOLLOWAY 1960) e PP1 (HOLLOWAY & VAN DE PUTTE 1968).

d) *Proteus*

Ocorre transdução generalizada em pelos menos duas espécies deste género: *P. mirabilis* (BÖHME 1963; COETZEE & SACHS 1960a, b; COETZEE 1963; PROZESKY & COETZEE 1966; APPELBAUM & PROZESKY 1973; NAKAYA & ROWND 1971) e *P. morganii* (COETZEE 1966).

e) *Acinetobacter*

Neste género existe transdução generalizada mediada pelo fago P78 (HERMAN & JUNI 1974).

f) *Staphylococcus*

A ocorrência de transdução generalizada foi estudada em pelo menos duas espécies: *S. aureus* (KLOOS & PATTEE 1965; POSTON 1966; PATTEE *et al.* 1968; YU & BALDWINN 1971) e *S. epidermidis* (YU & BALDWINN 1971;

MINSHEW & ROSENBLUM 1972; NAZAR *et al.* 1977; POSTON & PALMER 1977).

g) *Streptococcus*

O fenômeno de transdução foi estudado em três espécies deste gênero: *S. pyogenes*, em que ocorre transdução generalizada mediada pelo fago A25 (MALKE, 1973); *S. lactis* em que há transdução especializada do operão lactose (MCKAY *et al.* 1973) e *S. pneumoniae* e mque se observa pseudotransdução mediada pelo fago PG24 (PORTER *et al.* 1979).

h) *Klebsiella*

Em *K. aerogenes* há transdução generalizada mediada pelo fago temperado PW52 (MACPHEE *et al.* 1969; BRENCHLEY & MagasaniK 1974).

i) *Streptomyces*

Neste gênero de bactérias, apesar de ter sido isolado um número elevado de fagos, apenas se encontraram dois exemplos de transdução generalizada; em *S. venezuelae* mediada pelo fago virulento SVI e em *S. hygroscopicus*, mediada pelo fago temperado SH10 (LOMOVSKAYA *et al.* 1980).

j) *Bacillus*

Em *Bacillus* existem numerosos exemplos de transdução generalizada e alguns de transdução especializada.

Em *B. subtilis* ocorre transdução generalizada mediada pelos fagos SP10 (THORNE 1961), SP20 (GWINN & LAWTON 1968); S-1 (TAKAGI 1962; TAKAGI & IKEDA 1962), PBS1 (TAKAHASHI 1961), PBS2 (TAKAHASHI 1963), 3NT (CSISZAR & IVANOVICS 1964), AR9 (LOVE *et al.* 1976), SPP1 (YASBIN & YOUNG 1974), e ρ 15, 41c, 22a e SF6 (SANTOS *et al.* 1984) e transdução especializada mediada pelos fagos ϕ 105 (SHAPIRO *et al.* 1974; DEAN *et al.* 1976) e SP β (ZAhLER *et al.* 1977).

Em *B. licheniformis* ocorre transdução generalizada mediada pelos fagos SP10 e SP15 (THORNE 1961, 1962; TAYLOR & THORNE 1963; TYER-YAR *et al.* 1969), LP-51 e LP-52 (THORNE & KOWAŁSKI 1976) e CP-51 (REANNEY 1976).

Em *B. amyloliquefaciens* existe transdução generalizada mediada por SP10 (IIJIMA & IKEDA 1963; WELKER & CAMPBELL 1967).

Em *B. anthracis* verifica-se transdução generalizada mediada pelo fago CP-51 (THORNE 1968b).

Em *B. cereus* existe transdução generalizada mediada pelo fago CP-51 (THORNE 1968a, b; YELTON & THORNE 1970, 1971) e CP-53 (YELTON & THORNE 1970, 1971).

Em *B. pumilus* ocorre transdução generalizada mediada pelos fagos PBS1 e PBP1 (LOVETT 1972, LOVETT *et al.* 1974) e por PMB1 (BRAMUCCI & LOVETT 1976). O fago $\phi 75$ de *B. pumilus* medeia transdução do plasmídeo pPL10, mas não transduz marcas cromossômicas (BRAMUCCI & LOVETT 1977).

Em *B. thuringiensis* ocorre transdução generalizada mediada pelos fagos Th1 e SP15 (REANNEY 1976) e CP-51 e CP-54 (THORNE 1978).

BIBLIOGRAFIA

- ACKERMANN, H. W. (1974) — La classification des bacteriophages de *Bacillus* et *Clostridium*. *Pathol. Biol.* 22: 909-917.
- ACKERMANN, H. W. & EISENSTARK, A. (1974) — The present state of phage taxonomy. *Intervirology* 3: 201-219.
- ADAMS, J. N. & LURIA, S. E. (1958) — Transduction by bacteriophage P1. Abnormal phage function of the transducing particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 44: 590-594.
- ADAMS, M. H. (1959) — *Bacteriophages*. New York, London and Sydney: Wiley-Interscience.
- ADYE, J. (1962) — Effects of nitrous acid on transduction by *Salmonella* phage P22. *Virology* 18: 627-632.
- ANDERSON, T. F. (1945) — On a bacteriolytic substance associated with a purified virus. *J. Cel. Comp. Physiol.* 25: 17-26.
- ANDERSON, T. F. (1953) — The morphology and osmotic properties of bacteriophage systems. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 18: 197-203.
- APPELBAUM, P. C. & PROZESKY, O. W. (1973) — Transductional analysis of nonmotile mutants in *Proteus mirabilis*. *J. Gen. Microbiol.* 77: 89-97.
- ARBER, W. (1960) — Transduction of chromosomal genes and episomes in *Escherichia coli*. *Virology* 11: 273-288.
- ARBER, W. (1965) — Host-controlled modification of bacteriophage. *Ann. Rev. Microbiol.* 19: 365-378.
- ARBER, W. (1974) — DNA modification and restriction. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 14: 1-37.
- ARCHIBALD, A. R. (1980) — Phage receptors in gram-positive bacteria. In *Virus Receptors*, Part 1. Bacterial Viruses, pp. 5-26, Edited by L. L. Randall and L. Philipson. London and New York: Chapman and Hall.
- AVERY, O. T., MACLEOD, C. M. & MACCARTY, M. (1944) — Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. I. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J. Exp. Med.* 79: 137-158.

- BELYAEVA, N. N. & AZIZBEKYAN, R. R. (1968) — Fine structure of new *Bacillus subtilis* phage AR9 with complex morphology. *Virology* 34: 176-179.
- BENZINGER, R. & HARTMAN, P. E. (1962) — Effects of ultraviolet light on transducing phage P22. *Virology* 18: 614-626.
- BÖHME, H. (1963) — Transduction of prototrophy to auxotrophic mutants of *Proteus mirabilis*. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 10: 60-62.
- BOREK, E. & RYAN, A. (1973) — Lysogenic induction. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 13: 249-300.
- BORO, H. & BRENCHELY, J. E. (1971) — A new generalized transducing phage for *Salmonella typhimurium* LT2. *Virology* 45: 835-836.
- BOTSTEIN, D. (1968) — Synthesis and maturation of phage P22 DNA. I. Identification of intermediates. *J. Mol. Biol.* 34: 621-641.
- BOTSTEIN, D. & MATZ, M. J. (1970) — A recombination function essential to the growth of bacteriophage P22. *J. Mol. Biol.* 54: 417-440.
- BRAMUCCI, M. G. & LOVETT, P. S. (1976) — Low-frequency, PBS1-mediated plasmid transduction in *Bacillus pumilus*. *J. Bacteriol.* 127: 829-831.
- BRAMUCCI, M. G. & LOVETT, P. S. (1977) — Selective plasmid transduction in *Bacillus pumilus*. *J. Bacteriol.* 131: 1029-1032.
- BRENCHELY, J. E. & MAGASANIK, B. (1974) — Mutants of *Klebsiella aerogenes* lacking glutamate dehydrogenase. *J. Bacteriol.* 117: 544-550.
- BRENNER, S., CHAMPE, S. P., STREISINGER, G. & BARNETT, I. (1962) — On the interaction of adsorption cofactors with bacteriophages T2 and T4. *Virology* 17:30-39.
- BRON, S. & MURRAY, K. (1975) — Restriction and modification in *B. subtilis*. Nucleotide sequence recognized by restriction endonuclease R. *Bsu* R. from strain R. *Mol. Gen. Genet.* 143: 25-33.
- BRON, S., MURRAY, K. & TRAUTNER, T. A. (1975) — Restriction and modification in *B. subtilis*. Purification and general properties of a restriction endonuclease from strain R. *Mol. Gen. Genet.* 143: 13-23.
- CAMPBELL, A. (1960) — On the mechanism of the recombinational event in the formation of transducing phages. *Virology* 11: 339-348.
- CAMPBELL, A. (1962) — Episomes. *Adv. Genet.* 11: 101-145.
- CAMPBELL, A. (1964) — Transduction. In *The Bacteria*, vol. V, pp. 49-85. Edited by I. C. Gunsalus and R. Y. Stanier. New York and London: Academic Press.
- CANOSI, U., FERRARI, E., FALASCHI, A. & MAZZA, G. (1979) — Effect of 6-(p-hydroxyphenylazo)-uracil on the homologous and heterologous transduction processes in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 137: 124-128.
- CARO, L. & BERG, C. M. (1971) — P1 transduction. *Methods Enzymol.* 21: 444-458.
- CHAKRABARTY, A. M. & GUNSALUS, I. C. (1969) — Autonomous replication of a defective transducing phage in *Pseudomonas putida*. *Virology* 38: 92-104.
- CHAKRABARTY, A. M., GUNSALUS, C. F. & GUNSALUS, I. C. (1963). Transduction and the clustering of genes in fluorescent pseudomonads. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 60: 168-175.
- CHELALA, C. A. & MARGOLIN, P. (1974) — Effects of deletions on cotransduction linkage in *Salmonella typhimurium*: evidence that bacterial chromosome deletions affect the formation of transducing DNA fragments. *Mol. Gen. Genet.* 131: 97-112.
- COETZEE, J. N. & SACKS, T. G. (1960a) — Intrastrain transduction in *Proteus mirabilis*. *Nature (London)* 185: 869-870.
- COETZEE, J. N. & SACKS, T. G. (1960b) — Transduction of streptomycin resistance in *Proteus mirabilis*. *J. Gen. Microbiol.* 23: 445-455.

- COETZEE, J. N. (1963) — Transduction of swarming in *Proteus mirabilis*. *J. Gen. Microbiol.* 33: 1-7.
- COETZEE, J. N. (1966) — Transduction in *Proteus morgani*. *Nature (London)* 210: 220.
- COPELAND, J. C. & MARMUR, J. (1968) — Identification of conserved genetic functions in *Bacillus* by use of temperature-sensitive mutants. *Bacteriol. Rev.* 32: 302-312.
- CSISZAR, K. & IVANOVICS, G. (1964) — Transduction in *Bacillus subtilis*. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 12: 73.
- CURTISS, R. (1976) — Genetic manipulation of microorganisms: potential benefits and biohazards. *Ann. Rev. of Microbiol.* 30: 507-533.
- DEAN, D. H., HUTCHISON, K. & HALVORSON, H. O. (1976) — Specialized transduction in *Bacillus subtilis*. In *Microbiology 1976*, pp. 295-302. Edited by D. Schlessinger. Washington: American Society for Microbiology.
- DELBRÜCK, M. (1940) — The growth of bacteriophage under various physiological conditions of the host. *J. Gen. Physiol.* 23: 643-660.
- DOERMANN, A. H. (1952) — The intracellular growth of bacteriophages. I. Liberation of intracellular bacteriophage T4 by premature lysis with another phage or with cyanide. *J. Gen. Physiol.* 35: 645-656.
- DREXLER, H. (1970) — Transduction by bacteriophage T1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 66: 1083-1088.
- DREXLER, H. & KYLBERG, K. J. (1975) — Effect of UV irradiation on transduction by coliphage T1. *J. Virol.* 16: 263-266.
- DUBNAU, D. (1971) — Genetic mapping of *Bacillus subtilis*. *Methods in Enzymol.* 21: 430-438.
- DUBNAU, D., DAVIDOFF-ABELSON, R. & SMITH, I. (1969) — Transformation and transduction in *Bacillus subtilis*: evidence for separate modes of recombinant formation. *J. Mol. Biol.* 45: 155-179.
- EBEL-TSIPIS, J., BOTSTEIN, D. & FOX, M. S. (1972a) — Generalized transduction by phage P22 in *Salmonella typhimurium*. I. Molecular origin of transducing DNA. *J. Mol. Biol.* 71: 433-448.
- EBEL-TSIPIS, J., FOX, M. S. & BOTSTEIN, D. (1972b) — Generalized transduction by bacteriophage P22 in *Salmonella typhimurium*. II. Mechanism of integration of transducing DNA. *J. Mol. Biol.* 71: 449-469.
- ECHOLS, H. & MURIALDO, H. (1978) — Genetic map of bacteriophage lambda. *Microbiol. Rev.* 42: 577-591.
- EGGERTSSON, G. & ADELBERG, E. A. (1965) — Map position and specificities of repressor mutations in *Escherichia coli* K12. *Genetics* 52: 319-340.
- EPHRATI-ELIZUR, E. & FOX, M. S. (1961) — Comparison of transduction versus transformation of linked markers in *Bacillus subtilis*. *Nature (London)* 192: 433-434.
- FERRARI, E., CANOSI, U., GALIZZI, A. & MAZZA, G. (1978) — Studies on transduction process by SPP1 phage. *J. Gen. Virol.* 41: 563-572.
- FODOR, K. & ALFÖLDI, L. (1976) — Fusion of protoplasts of *Bacillus megaterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73: 2147-2150.
- FODOR, K. & ALFÖLDI, L. (1979) — Polyethylene-glycol induced fusion of bacterial protoplasts. Direct selection of recombinants. *Mol. Gen. Genet.* 168: 55-59.
- FOSS, H. M. & STAHL, F. W. (1963) — Circularity of the genetic map of bacteriophage T4. *Genetics* 48: 1659-1672.
- FRAENKEL-CONRAT, H. (1956) — The role of the nucleic acid in the reconstitution of active tobacco mosaic virus. *J. American Chem. Soc.* 78: 882-883.
- FRANKEL, F. R. (1966a) — The absence of mature phage DNA molecules from the replicating pool of T-even infected *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 18: 109-126.

- FRANKEL, F. R. (1966b) — Studies on the nature of replicating DNA in T4 infected *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 18: 127-143.
- FRANKEL, R. W. & JOYS, T. M. (1966) — Adsorption specificity of bacteriophage PBS1. *J. Bacteriol.* 92: 388-389.
- FUERST, C. R. (1966) — Defective biotin-transducing mutants of bacteriophage lambda. *Virology* 30: 581-583.
- GAREN, A. & ZINDER, N. D. (1955) — Radiological evidence for partial genetic homology between bacteriophage and host bacteria. *Virology* 1: 347-376.
- GIERER, A. & SCHRAMM, G. (1956) — Infectivity of ribonucleic acid from tobacco mosaic virus. *Nature (London)* 177: 702-703.
- GLASER, L., IONESCO, H. & SCHAEFFER, P. (1966) — Teichoic acids as components of a specific phage receptor in *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 124: 415-417.
- GOLDBERG, I. D. & BRYAN, T. (1968) — Productive infection of *Bacillus subtilis* 168, with bacteriophage SP-10, dependent upon inducing treatments. *J. Virol.* 2: 805-812.
- GRAHAM, J. B. & ISTOCK, C. A. (1978) — Genetic exchange in *Bacillus subtilis* in soil. *Mol. Gen. Genet.* 166: 287-290.
- GRAHAM, J. B. & ISTOCK, C. A. (1979) — Gene exchange and natural selection cause *Bacillus subtilis* to evolve in soil culture. *Science* 204: 637-639.
- GRATIA, J. P. (1973) — Coliphage $\phi\gamma$, a novel type of specialized transducer. *Mol. Gen. Genet.* 124: 157-166.
- GRIFFITH, F. (1928) — Significance of pneumococcal types. *J. Hyg.* 27: 113-159.
- GROSS, J. & ENGBERG, E. (1959) — Determination of the order of mutational sites governing L-arabinose utilization in *Escherichia coli* B/r by transduction with phage P1bt. *Virology* 9: 314-331.
- GRYZAN, T. J., CONTENTE, S. & DUBNAU, D. (1978) — Characterization of *Staphylococcus aureus* plasmids introduced by transformation into *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 134: 318-329.
- GWINN, D. D. & LAWTON, W. D. (1968) — Alteration of host specificity in *Bacillus subtilis*. *Bacteriol. Rev.* 32: 297-301.
- HEMPHILL, H. E. & WHITELEY, H. R. (1975) — Bacteriophages of *Bacillus subtilis*. *Bacteriol. Rev.* 39: 257-315.
- HENNER, D. J. & HOCH, J. A. (1980) — The *Bacillus subtilis* chromosome. *Microbiol. Rev.* 44: 57-82.
- HERMAN, N. J. & JUNI, E. (1974) — Isolation and characterization of a generalized transducing bacteriophage for *Acinetobacter*. *J. Virol.* 13: 46-52.
- HERSHEY, A. D. & CHASE, M. (1952) — Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* 36: 39-56.
- HERTEL, R., MARCHI, L. & MÜLLER, K. (1962) — Density mutants of phage T5. *Virology* 18: 576-581.
- HILLIKER, S. & BOTSTEIN, D. (1976) — Specificity of genetic elements controlling regulation of early functions in temperate bacteriophages. *J. Mol. Biol.* 106: 537-566.
- HOCH, J. A., BARAT, M. & ANAGNOSTOPOULOS, C. (1967) — Transformation and transduction in recombination-defective mutants of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 93: 1925-1937.
- HOLLOWAY, B. W. & MONK, M. (1959) — Transduction in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature (London)* 184: 1426-1427.
- HOLLOWAY, B. W. (1960) — Grouping *Pseudomonas aeruginosa* by lysogenicity and pyocinogenicity. *Journal of Pathology and Bacteriology* 80: 448-450.
- HOLLOWAY, B. W. & FARGIE, B. (1960) — Fertility factors and genetic linkage in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 80: 362-363.

- HOLLOWAY, B. W. & VAN DE PUTTE, P. (1968) — Transducing phage for *Pseudomonas putida*. *Nature, London* 217: 459-460.
- HOLLOWAY, B. W. (1969) — Genetics of *Pseudomonas*. *Bacteriol. Rev.* 33: 419-443.
- HOLLOWAY, B. W., MONK, M., HODGINS, L. & FARGIE, B. (1962) — Effects of radiation on transduction in *Pseudomonas aeruginosa*. *Virology* 18: 89-94.
- HUNTER, B. I., YAMAGISHI, H. & TAKAHASHI, I. (1967) — Molecular weight of bacteriophage PBS1 deoxyribonucleic acid. *J. Virol.* 1: 841-842.
- IJIMA, T. & IKEDA, Y. (1963) — Transduction of amylase productivity of *Bacillus subtilis* by bacteriophage. *J. Gen. Appl. Microbiol.* (Tokyo) 9: 97-100.
- IKEDA, H. & TOMIZAWA, J.-I. (1965a) — Transducing fragments in generalized transduction by phage P1. I. Molecular origin of the fragments. *J. Mol. Biol.* 14: 85-109.
- IKEDA, H. & TOMIZAWA, J.-I. (1965b) — Transducing fragments in generalized transduction by phage P1. II. Association of DNA and protein in the fragments. *J. Mol. Biol.* 14: 110-119.
- IKEDA, H. & TOMIZAWA, J.-I. (1965c) — Transducing fragments in generalized transduction by phage P1. III. Studies with small phage particles. *J. Mol. Biol.* 14: 120-129.
- JACOB, F. (1955) — Transduction of lysogeny in *Escherichia coli*. *Virology* 1: 207-220.
- JACOB, F. & FRUEST, C. R. (1958) — The mechanism of lysis by phage studied with defective lysogenic bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 18: 518-528.
- JACOBSON, E. D. & LANDMAN, O. E. (1975) — Interaction of protoplasts, L forms, and bacilli of *Bacillus subtilis* with 12 strains of bacteriophage. *J. Bacteriol.* 124: 445-448.
- JACOBSON, E. D. & LANDMAN, O. E. (1976) — Interaction of bacteriophage with walled and wall-less forms of *Bacillus subtilis*. In *Microbiology — 1976*, pp. 238-252. Edited by D. Schlessinger. Washington: American Society for Microbiology.
- JAMET, C. & ANAGNOSTOPOULOS, C. (1969) — Étude d'une mutation très faiblement transformable au locus de la thréonine désaminase de *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 105: 225-242.
- JOYS, T. M. (1965) — Correlation between susceptibility to bacteriophage PBS1 and motility in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 90: 1575-1577.
- KAISER, A. D. (1962) — The production of phage chromosome fragments and their capacity for genetic transfer. *J. Mol. Biol.* 4: 275-287.
- KARAMATA, D. & GROSS, J. D. (1970) — Isolation and genetic analysis of temperature-sensitive mutants of *Bacillus subtilis* defective in DNA synthesis. *Mol. Gen. Genet.* 103: 277-287.
- KELLENBERGER, E., BOLLE, A., BOY DE LA TOUR, E., R. H.; FRANKLIN, M. C., JERNE, N. K., REALE-SCAFATI, A., SÉCHAUD, J., BENDET, I., GOLDSTEIN, D. & LAUFFER, N. R. (1965) — Functions and properties related to the tail fibres of bacteriophage T4. *Virology* 26: 419-440.
- KLOOS, W. E., & PATTEE, P. A. (1965) — Transduction analysis of the histidine region in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* 39: 195-207.
- KOCH, G. & DREYER, W. J. (1958) — Characterization of an enzyme of phage T2 as a lysozyme. *Virology* 6: 291-293.
- LACKS, S. (1977) — Binding and entry of DNA in pneumococcal transformation. In *Modern Trends In Bacterial Transformation and Transfection*, pp. 35-44. Amsterdam, New York Oxford: North-Holland Publishing Company.
- LEDERBERG, J. & TATUM, R. L. (1946) — Novel genotypes in mixed cultures of biochemical mutants of bacteria. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 11: 113-114.
- LEDERBERG, J. (1956) — Linear inheritance in transductional clones. *Genetics* 41: 845-871.

- LEDERBERG, J., LEDERBERG, E. M., ZINDER, N. D. & LIVELY, E. R. (1951) — Recombination analysis of bacterial heredity. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 16: 413-443.
- LENCASTRE, H. & ARCHER, L. J. (1979) — Transducing activity of bacteriophage SPP1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 86: 915-919.
- LENCASTRE, H. & ARCHER, L. J. (1980) — Characterization of bacteriophage SPP1 transducing particles. *J. Gen. Microbiol.* 117: 347-355.
- LENCASTRE, H. ARCHER, L. J. (1981) — Molecular origin of transducing DNA in bacteriophage SPP1. *J. Gen. Microbiol.* 122: 345-349.
- LENNOX, E. S. (1955) — Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* 1: 190-206.
- LEPESANT-KEJZLAROVÁ, J., LEPESANT, J. A., WALLE, J., BILLAULT, A. & DONDONER, R. (1975) — Revision of the linkage map of *Bacillus subtilis* 168: indications for circularity of the chromosome. *J. Bacteriol.* 121: 823-834.
- LINDBERG, A. A. (1973) — Bacteriophage receptors. *Annu. Rev. Microbiol.* 27: 205-241.
- LOMOVSKAYA, N. D., CHATER, K. F. & MKRTUMIAN, N. M. (1980) — Genetics and molecular biology of *Streptomyces* bacteriophages. *Microbiol. Rev.* 44: 206-229.
- LOUTIT, J. S. (1958) — A transduction-like process within a single strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* 18: 315-319.
- LOUTIT, J. S. (1959) — Effect of ultra-violet irradiation on transduction in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature, London* 184: 1960-1961.
- LOVE, E., D'AMBROSIO, J., BROWN, N. C. & DUBNAU, D. (1976) — Mapping of the gene specifying DNA polymerase III of *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 144: 313-321.
- LOVETT, P. S. & YOUNG, F. E. (1970) — Genetic analysis in *Bacillus pumilus* by PBS1-mediated transduction. *J. Bacteriol.* 101: 603-608.
- LOVETT, P. S. & YOUNG, F. E. (1971) — Linkage groups in *Bacillus pumilus* determined by bacteriophage PBS1-mediated transduction. *J. Bacteriol.* 106: 697-699.
- LOVETT, P. S. (1972) — PBPI: a flagella-specific bacteriophage mediating transduction in *Bacillus pumilus*. *Virology* 47: 743-752.
- LOVETT, P. S., BRAMUCCI, D., BRAMUCCI, M. G. & BURDICK, B. D. (1974) — Some properties of the PBPI transduction system in *Bacillus pumilus*. *J. Virol.* 13: 81-84.
- LURIA, S. E. & STEINER, D. L. (1954) — The role of calcium in the penetration of bacteriophage T5 into its host. *J. Bacteriol.* 67: 635-639.
- LURIA, S. E., TDAMS, J. N. & TING, R. C. (1960) — Transduction of lactose-utilizing ability among strains of *E. coli* and *S. dysenteriae* and the properties of the transducing phage particles. *Virology* 12: 348-390.
- MACHATTIE, L. A., RITCHIE, D. A., THOMAS JNR., C. A. & RICHARDSON, C. C. (1967) — Terminal repetition in permuted T2 bacteriophage DNA molecules. *J. Mol. Biol.* 23: 355-363.
- MACKAY, D. J. & BODE, V. C. (1976a) — Events in lambda injection between phage adsorption and DNA entry. *Virology* 72: 154-166.
- MACKAY, D. J. & BODE, V. C. (1976b) — Binding to isolated phage receptors and lambda DNA release *in vitro*. *Virology* 72: 167-181.
- MACPHEE, D. G., SUTHERLAND, I. W. & WILKINSON, J. F. (1969) — Transduction in *Klebsiella*. *Nature (London)* 221: 475-476.
- MAHLTR, I., CAHOON, M. & MARMUR, J. (1964) — *Bacillus subtilis* deoxyribonucleic acid transfer in PBS2 transduction. *J. Bacteriol.* 87: 1423-1428.
- MALKE, H. (1973) — Phage A25-mediated transfer induction of a prophage in *Streptococcus pyogenes*. *Mol. Gen. Genet.* 125: 251-264.

- MATSUSHIRO, A. (1963) — Specialised transduction of tryptophan markers in *Escherichia coli* K-12 by bacteriophage ϕ 80. *Virology* 19: 475-482.
- MCINTIRE, S. A. (1974) — Transduction with integration-defective mutants of *Salmonella typhimurium* bacteriophage KBl. *J. Bacteriol.* 117: 907-908.
- MCKAY, L. L., CORDS, B. R. & BALDWIN, K. A. (1973) — Transduction of lactose metabolism in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 115: 810-815.
- MILLER, R. V., PEMBERTON, J. M. & RICHARDS, K. E. (1974) — F116, D3 and G101: temperate bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*. *Virology* 59: 566-569
- MILLER, R. V., PEMBERTON, J. M. & CLARK, A. J. (1977) — Prophage F116: evidence for extrachromosomal location in *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO: *J. Virol.* 22: 844-847.
- MINSHEW, B. H. & ROSEMBLUM, E. D. (1972) — Transduction of tetracycline resistance in *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemotherm.* 1: 508-511.
- MORRISON, W. D., MILLER, R. V., & SAYLER, G. S. (1978) — Frequency of F116-mediated transduction of *Pseudomonas aeruginosa* in a freshwater environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 724-730.
- MORSE, M. L. (1954) — Transduction of certain loci in *Escherichia coli* K-12. *Genetics* 39: 984-985.
- MORSE, M. L., LEDERBERG, E. M. & LEDERBERG, J. (1956) — Transduction in *Escherichia coli* K-12. *Genetics* 41: 142-156.
- NAKAYA, R. & ROWND, R. (1971) — Transduction of R factors by a *Proteus mirabilis* bacteriophage. *J. Bacteriol.* 106: 773-783.
- NAZAR, K., HECZKO, P. B. & PULVERER, G. (1977) — Transduction of penicillin resistance together with ability to ferment mannitol and ribose in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Gen. Microbiol.* 99: 449-452.
- OKUBO, S., STODOLSKY, M., BOTT, K. & STRAUSS, B. (1963) — Separation of the transforming and viral deoxyribonucleic acids of a transducing bacteriophage of *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 50: 679-686.
- OZEKI, H. (1959) — Chromosome fragments participating in transduction in *Salmonella typhimurium*. *Genetics* 44: 457-470.
- OZEKI, H. & IKEDA, H. (1968) — Transduction mechanisms. *Ann. Rev. Genet.* 2: 245-278:
- PARANCHYCH, W. (1966) — Stages in phage R17 infection: the role of divalent cations. *Virology* 28: 90-99.
- PARKINSON, J. S. & HUSKEY, R. J. (1971) — Deletion mutants of bacteriophage lambda. I. Isolation and initial characterization. *J. Mol. Biol.* 56: 369-384.
- PATTEE, P. A., KLOOS, W. E., BODENSTEINER, J. B. & ZARA, A. (1968) — Homogeneity in a *Staphylococcus aureus* transducing fragment. *J. Virol.* 2: 652-654.
- PEARCE, L. E., & LOUITT, J. S. (1965) — Biochemical and genetic grouping of isoleucine-valine mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 89: 58-63.
- PORTER, R. D., SHOEMAKER, N. B., RAMPE, G. & GUILD, W. R. (1979) — Bacteriophage-associated gene transfer in *Pneumococcus*: transduction or pseudotransduction? *J. Bacteriol.* 137: 556-567.
- POSTON, S. M. (1966) — Cellular location of the genes controlling penicillase production and resistance to streptomycin and tetracyclin in a strain of *Staphylococcus aureus*. *Nature (London)* 210: 802-804.
- POSTON, S. M. & PALMER, T. J. (1977) — Transduction of penicillase production and other antibiotic-resistance markers in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Gen. Microb.* 103: 235-242.
- PROZESKY, O. W. & COETZEE, J. N. (1966) — Linked transduction in *Proteus mirabilis*. *Nature (London)* 209: 1262.

- RAIMONDO, L. M., LUNDH, N. P. & MARTINEZ, R. J. (1968) — Primary adsorption site of phage PBS1: the flagellum of *Bacillus subtilis*. *J. Virol.* 2: 256-264.
- RAJ, A. S., RAJ, A. Y. & SCHMIFGER, H. (1974) — Phage genes involved in the formation of generalized transducing particles in *Salmonella*-phage P22. *Mol. Gen. Genet.* 135: 175-184.
- REANNEY, D. (1976) — Extrachromosomal elements as possible agents of adaptation and development. *Bacteriol. Rev.* 40: 552-590.
- REILLY, B. E. (1976) — Bacteriophage of *Bacillus subtilis* as a paradigm of bacteriophage of Bacilli. In *Microbiology-1976*, pp. 228-237. Edited by D. Sclessinger. Washington D. C.: American Society for Microbiology.
- RHOADES, M., MACHATTIE, L. A. & THOMAS JNR., C. A. (1968) — The P22 bacteriophage DNA molecule. I. The mature form. *J. Mol. Biol.* 37: 21-40.
- RIMA, B. K. & STEENSMAN, H. Y. (1971) — Bacteriophages of *Bacillus subtilis*: comparison of different isolation techniques and possible use for classification of *Bacillus subtilis* strains. *Antonie van Leeuwenhoek* 37: 409-416.
- RIMA, B. K. & VAN KLEEFF, B. H. A. (1971) — Similarity of *Bacillus subtilis* bacteriophages PBS1, 3NT, and 110. Some remarks on the morphology of phage heads. *Antonie van Leeuwenhoek* 37: 265-274.
- RIVA, S., POLSINELLI, M. & FALASCHI, F. (1968) — A new phage of *Bacillus subtilis* with infectious DNA having separable strands. *J. Mol. Biol.* 35: 347-356.
- SAITO, H., SHIBATA, T. & ANDO, T. (1979) — Mapping of genes determining nonpermissiveness and host-specific restriction to bacteriophages in *Bacillus subtilis* Marburg. *Mol. Gen. Genet.* 170: 117-122.
- SANDRI, R. M. & BERGER, H. (1980a) — Bacteriophage P1-mediated generalized transduction in *Escherichia coli*: fate of transduced DNA in Rec⁺ and Rec A⁻ recipients. *Virology* 106: 14-29.
- SANDRI, R. M. & BERGER, H. (1980b) — Bacteriophages P1-mediated generalized transduction in *Escherichia coli*: structure of abortively transduced DNA. *Virology* 106: 30-40.
- SANTOS, M. A., LENCASTRE, H. & ARCHER, L. J. (1984) — Homology between phages SPPI, 41c, 22a, ρ_{15} and SF6 of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Virol.* 65: 2067-2072.
- SCHAEFFER, P., CAMI, B. & HOTCHKISS, R. D. (1976) — Fusion of bacterial protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73: 2151-2155.
- SCHMIEGER, H. (1970) — The molecular structure of the transducing particles of *Salmonella* phage P22. II. Density gradient analysis of DNA. *Mol. Gen. Genet.* 109: 323-337.
- SCHMIEGER, H. (1971) — A method for detection of phage mutants with altered transducing ability. *Mol. Gen. Genet.* 110: 378-381.
- SCHMIEGER, H. (1972) — Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities. *Mol. Gen. Genet.* 119: 75-88.
- SCHMIEGER, H. & BACKHAUS, H. (1976) — Altered cotransduction frequencies exhibited by HT-mutants of *Salmonella*-phage P22. *Mol. Gen. Genet.* 143: 307-309.
- SÉCHAUD, J., STREISINGER, G., ENRICH, J., NEWTON, J., LANFORD, H., REINHOLD, H. & STAHL, M. M. (1965) — Chromosome structure in phage T4. II. Terminal redundancy and heterozygosity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 54: 1333-1339.
- SHAPIRO, J. A., DEAN, D. H. & HALVORSON, H. O. (1974) — Low-frequency specialized transduction with *Bacillus subtilis* bacteriophage ϕ_{105} . *Virology* 62: 393-403.
- SHIFLETT, M. A., BROOKS, D. & YOUNG, F. E. (1977) — Cell wall and morphological changes induced by temperature shift in *Bacillus subtilis* cell wall mutants. *J. Bacteriol.* 132: 681-690.

- SMITH, H. O. (1968) — Defective phage formation by lysogens of integration-deficient phage P22 mutants. *Virology* 34: 203-223.
- SMITH-KEARY, P. F. (1966) — Restricted transduction by bacteriophage P22 in *Salmonella typhimurium*. *Genetic Res.* 8: 73-82.
- STEENSMA, H. Y. & BLOCK, J. (1979) — Effect of calcium ions on the infection of *Bacillus subtilis* by bacteriophage SF6. *J. Gen. Virol.* 42: 305-314.
- STENT, G. S. (1963) — *Molecular Biology of Bacterial Viruses*. Edited by R. Emerson, D. M. Whitaker and G. W. Beadle. San Francisco and London: W. H. Freeman and Company.
- STOCKER, B. A. D. (1956) — Abortive transduction of motility in *Salmonella*: a non-replicated gene transmitted through many generations to a single descendant. *J. Gen. Microbiol.* 15: 575-598.
- STOCKER, B. A. D., ZINDER, N. D. & LEDERBERG, J. (1953) — Transduction of flagellar characters in *Salmonella*. *J. Gen. Microbiol.* 9: 410-433.
- STREISINGER, G. & BRUCE, V. (1960) — Linkage of genetic markers in phages T2 and T4. *Genetics* 45: 1289-1296.
- STREISINGER, G., MUKAY, F., DREYER, W. J., MILLER, B. & HORIUCHI, S. (1961) — Mutations affecting the lysozyme of phage T4. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 26: 25-30.
- STREISINGER, G., EDGAR, R. S. & DENHARDT, G. H. (1964) — Chromosome structure in phage T4. Circularity of the linkage map. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 51: 775-779.
- STREISINGER, G., ENRICH, J. & STAHL, M. M. (1967) — Chromosome structure in phage T4. III. Terminal redundancy and length determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 57: 292-295.
- TAKAGI, J. (1962) — Transduction in *Bacillus subtilis* studied with a temperate phage S-1. *J. Gen. Appl. Microbiol. (Tokyo)* 8: 214-222.
- TAKAGI, J. & IKEDA, Y. (1962) — Transformation of genetic traits by the DNA prepared from a lysogenic phage S-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 7: 482-485.
- TAKAHASHI, I. (1961) — Genetic transduction in *Bacillus subtilis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 5: 171-175.
- TAKAHASHI, I. (1963) — Transducing phages for *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microb.* 31: 211-217.
- TAYLOR, M. J. & THORNE, C. B. (1963) — Transduction of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* by each of two phages. *J. Bacteriol.* 86: 452-461.
- THOMAS JR., C. T. & MACHATTIE, L. A. (1964) — Circular T2 DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 52: 1297-1301.
- THORNE, C. B. (1961) — Transduction in *Bacillus subtilis*. *Fed. Proc.* 20: 254.
- THORNE, C. B. (1962) — Transduction in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 83: 106-111.
- THORNE, C. B. (1968a) — Transducing bacteriophage for *Bacillus cereus*. *J. Virol.* 2: 657-662.
- THORNE, C. B. (1968b) — Transduction in *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. *Bacteriol. Rev.* 32: 358-361.
- THORNE, C. B. (1978) — Transduction in *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environm. Microbiol.* 35: 1109-1115.
- THORNE, C. B. & KOWALSKI, J. B. (1976) — Temperate bacteriophages for *Bacillus licheniformis*. In *Microbiology — 1976*, pp. 303-314. Edited by D. Schlessinger. Washington: American Society for Microbiology.

- TRAUTNER, T. A., PAWLEK, B., BRON, S. & ANAGNOSTOPOULOS, C. (1974) — Restriction and modification in *B. subtilis*. Biological aspects. *Mol. Gen. Genetic.* 131: 181-191.
- TYE, B. K. (1976) — A mutant of phage P22 with randomly permuted DNA. *J. Mol. Biol.* 100: 421-426.
- TYE, B. K., CHAN, R. K. & BOTSTEIN, D. (1974a) — Packaging of an oversize transducing genome by *Salmonella* phage P22. *J. Mol. Biol.* 85: 485-500.
- TYE, B. K., HUBERMAN, J. A. & BOTSTEIN, D. (1974b) — Non-random circular permutation of phage P22 DNA. *J. Mol. Biol.* 85: 501-532.
- TYERYAR, F. J., TAYLOR, M. J., LAWTON, W. D. & GOLDBERG, I. D. (1969) — $\text{C}\alpha$ transduction and cotransformation of genetic markers in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* 100: 1027-1036.
- WATANABE, K. & TAKESUE, S. (1972) — The requirement for calcium in infection with *Lactobacillus* phage. *J. Gen. Virol.* 17: 19-30.
- WEAVER, S. & LEVINE, M. (1978) — Replication *in situ* and DNA encapsulation following induction of an excision-defective lysogen of *Salmonella* bacteriophage P22. *J. Mol. Biol.* 118: 389-411.
- WEIDEL, W. (1951) — Further studies on the membrane of *E. coli* B. *Annales de l'Institut Pasteur* 84: 60.
- WELKER, N. E. & CAMPBELL, L. L. (1967) — Unrelatedness of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 94: 1124-1130.
- WILSON, G. G., YOUNG, K. K. Y., EDLIN, G. J. & KONINGSBERG, W. (1979) — High-frequency generalised transduction by bacteriophage T4. *Nature (London)* 280: 80-82.
- WILSON, J. J. & TAKAHASHI, I. (1978) — Adsorption of *Bacillus subtilis* bacteriophage PBS1. *Can. J. Microbiol.* 24: 1-8.
- WING, J. P. (1968) — Transduction by phage P22 in a recombinant-deficient mutant of *Salmonella typhimurium*. *Virology* 36: 271-276.
- WOLLMAN, E. L. (1963) — Transduction spécifique du marqueur biotine par le bacteriophage λ . *Comptes Rendus (Hebdomadaires) de Seances de l'Academie de Sciences, Paris* 257: 4225-4226.
- WRIGHT, A. & KANEGASAKI, S. (1971) — Molecular aspects of lipopolysaccharides. *Physiol. Rev.* 51: 748-784.
- YAJIMA, Y., SAITO, H. & IKEDA, Y. (1979) — Mechanisms of nonpermissiveness in abortive infection of bacteriophage ϕ NR2 in *Bacillus subtilis* Marburg strain. *J. Gen. Appl. Microbiol. (Tokio)* 23: 291-299.
- YAMAGISHI, H. & TAKAHASHI, I. (1968) — Transducing particles of PBS1. *Virology* 36: 639-645.
- YASBIN, R. E. & YOUNG, F. E. (1974) — Transduction in *Bacillus subtilis* by bacteriophage SPPI. *J. Virol.* 14: 1343-1348.
- YASBIN, R. E., MAINO, V. C. & YOUNG, F. E. (1976) — Bacteriophage resistance in *Bacillus subtilis* 168, W23, and inter-strain transformants. *J. Bacteriol.* 125: 1120-1126.
- YELTON, D. B. & THORNE, C. B. (1970) — Transduction in *Bacillus cereus* by each of two bacteriophages. *J. Bacteriol.* 102: 573-579.
- YELTON, D. B. & THORNE, C. B. (1971) — Comparison of *Bacillus cereus* bacteriophages CP-51 and CP-53. *J. Virol.* 8: 242-253.
- YOUNG, F. E. (1967) — Requirement of glucosylated teichoic acid for adsorption of phage in *Bacillus subtilis* 168. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 58: 2377-2384.

- YOUNG, F. E. & WILSON, G. A. (1972) — Genetics of *Bacillus subtilis* and other gram-positive sporulating bacilli. In *Spores V*, pp. 77-106. Edited by H. O. Halvorson, R. Hanson and L. L. Campbell. Washington, D. C.: American Society for Microbiology.
- YOUNG, F. E., SMITH, C. & REILLY, B. E. (1969) — Chromosomal location of genes regulating resistance to bacteriophage in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 98: 1087-1097.
- YOUNG, I. I., LEVINSTONE, D., EDEN, M., TYE, B-K. & BOTSTEIN, D. (1974) — Alignment of partial denaturation maps of circularly permuted DNA by computer. *J. Mol. Biol.* 85: 528-532.
- YU, L. & BALDWIN, J. N. (1971) — Intraspecific transduction in *Staphylococcus epidermidis* and interspecific transduction between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Can. J. Microbiol.* 17: 767-773.
- ZAHLER, S. A., KORMAN, R. Z., ROSENTHAL, R. & HEMPHILL, H. E. (1977) — *Bacillus subtilis* bacteriophage SP β : localization of the prophage attachment site, and specialized transduction. *J. Bacteriol.* 129: 556-558.
- ZINDER, N. D. & LEDERBERG, J. (1952) — Genetic exchange in *Salmonella*. *J. Bacteriol.* 64: 679-699.
- ZINDER, N. D. (1953) — Infective heredity in bacteria. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 18: 261-269.
- ZINDER, N. D. (1955) — Bacterial transduction. *J. Cel. Comp. Physiol.* 45 (suppl. 2): 23-49.
- ZINDER, N. D. (1958a) — «Transduction» in bacteria. *Sci. Amer.* 106: 1-7.
- ZINDER, N. D. (1958b) — Lysogenization and superinfection immunity in *Salmonella*. *Virology* 5: 291-326.
- ZINDER, N. D. & LYONS, L. B. (1968) — Cell lysis: another function of the coat protein of the bacteriophage f2. *Science* 159: 84-86.

SUR LA CARYOLOGIE DE *LAVANDULA LATIFOLIA*
MEDICUSI—LA MICROSPOROGÉNÈSE CHEZ LES PLANTES DU PORTUGAL
À $2n=36$

A. Fernandes* & M. Teresa Leitão*

Institut Botanique de l'Université de Coimbra

SUMMARY

The study of the microsporogenesis of a cytotype of *Lavandula latifolia* Medicus with 36 somatic chromosomes growing spontaneously in Portugal near Coimbra and also near Leiria has shown meiosis occurring regularly as in diploid plants. In fact, neither tetravalents, trivalents and univalents, nor anomalies of disjunction were detected. Moreover, the tetrads and the pollen grains were also normal.

Cytomixis phenomena were observed at the pachytene and diplotene. At diakinesis 2 bivalents were seen attached to the nucleolus, showing the existence of 4 nucleolar chromosomes, in accordance with the presence of 4 haploid chromosome sets. One anaphase I showing separation of 36 chromosomes towards each pole was observed.

Species of the sections *Pterostoechas* Ging. and *Lavandula* with $2n=12$ and $2n=18$ respectively, were not undoubtedly found so far. Thus we could think that the numbers 12 and 18 are the basic numbers of these two sections. In this case the meiosis of the plants of *L. latifolia* with $2n=54$ would be that of a triploid, but, as far as we know, this do not happen. On the other hand, the existence of the basic secondary number $X_2=15$, proceeding by amphidiploidy between two species of the *Pterostoechas* and *Lavandula* sections, is not in accordance with the presence of a single haploid set in the plants with 12 and 18 chromosomes. Thus it is more probable that the basic numbers of the referred sections are 6 and 9. The fact that sect. *Pterostoechas* contains more taxa than sect. *Lavandula* and has a larger area of distribution, shows the probability of 6 being primitive, and 9 a derivative of 6. The derivation could be achieved from a plant with 18 chromosomes, containing 3 sets of 6 chromosomes, two of which homologous and one not homologous. The non-homologous set could have supplied the 3 chromosomes which raised the number 6 to 9.

The differentiation of the 36 chromosome-tetraploid could have been accompanied by diploidization phenomena which have decreased or suppress the association of chromosomes in multivalents.

* Centro de Fito-sistemática e Fito-ecologia, E₂C₂, do Instituto Nacional de Investigação Científica (I.N.I.C.).

The occurrence of anaphases I with 36 chromosomes allows us to suppose the appearance of forms with $2n=54$ and $2n=72$ among the offsprings of the plants with $2n=36$.

RÉSUMÉ

En étudiant la microsporogénèse chez des plantes de *Lavandula latifolia* Medicus à $2n=36$ croissant au Portugal à l'état naturel, nous avons constaté que la méiose se déroule normalement comme s'il s'agissait de plantes diploïdes. En effet, des tétravalents, trivalents ou univalents n'ont pas été observés, ainsi qu'aucune anomalie de disjonction. D'autre part, les tétrades étaient normales et le pollen bien conformé.

Des phénomènes de cytomixie ont été observés au pachytène et au diplotène. À la diacinèse nous avons constaté la présence de 2 bivalents attachés au nucléole, ce qui montre l'existence de 4 chromosomes nucléolaires, d'accord avec l'idée de la présence de 4 garnitures haploïdes. Une anaphase I a été observée dans laquelle 36 chromosomes étaient en train de se séparer vers chaque pôle.

Étant donné que dans les sections *Pterostoechas* Ging. et *Lavandula* on n'a pas rencontré indubitablement jusqu'à ce jour des plantes à $2n=12$ et à $2n=18$, respectivement, on pourrait penser que les chiffres 12 et 18 fussent les nombres de base de ces sections. Le fait que la méiose des plantes à $2n=54$ de *L. latifolia*, en tant que nous le savons, ne correspond pas à celle d'un triploïde ne s'accorde pas avec ce point de vue. D'autre part, le chiffre de base secondaire $X_2=15$, issu très probablement d'amphidiploïdie entre des espèces des sections ci-dessus mentionnées, ne s'accorde pas aussi avec l'idée de l'existence d'une seule garniture haploïde dans les plantes à 12 et à 18 chromosomes. De cette façon, il est plus probable que les chiffres de base des deux sections soient 6 et 9. Par le fait que la sect. *Pterostoechas* possède un plus grand nombre de taxa que la sect. *Lavandula* et qu'elle présente aussi une aire bien plus vaste, il est probable que 6 soit primitif et 9 dérivé de 6, à partir d'une plante à 2 garnitures homologues et une autre non homologue, qui a fourni les 3 chromosomes qui ont fait monter le chiffre 6 vers 9.

La formation des tétraploïdes à $2n=36$ aurait été suivie de phénomènes de diploïdisation, qui ont abaissé ou même supprimé les associations chromosomiques.

L'occurrence d'anaphases I à 36 chromosomes laisse prévoir que des formes à $2n=54$ et à $2n=72$ puissent apparaître dans la descendance des plantes à $2n=36$.

INTRODUCTION

D'accord avec A. FERNANDES, R. FERNANDES & M. T. ALMEIDA (sous presse), *Lavandula latifolia* Medicus occupe au Portugal une aire peu étendue se limitant aux collines calcaires dolomitiques du Rétien-Hétangien situées au sud de Coimbra et à une autre localisée aux environs de Leiria (Alto do Vieiro).

Le nombre chromosomique de cette espèce a été tout d'abord déterminé par GARCIA (1942), qui a dénombré $2n=54$. En 1974, KÜPFER indique $2n=50$ pour des plantes croissant aussi au Portugal et ce chiffre a été confirmé par QUEIRÓS

(1983). FERNANDES & LEITÃO (1982a, 1982b, 1984), en comptant $2n = 36, 54$ et 75 , montrent que les populations du Portugal sont complexes et qu'il y en aura probablement un mélange de quelques cytotypes à l'état spontané.

Dans le but de contribuer à une meilleure connaissance de la caryologie de cette espèce et d'essayer à éclaircir le nombre et l'origine des cytotypes existants au Portugal (l'espèce se trouve aussi en Espagne, Iles Baléares, sud de la France, Italie et Dalmatie), nous avons entrepris une série de recherches dont nous rapportons ici les résultats de la première.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Des graines de *L. latifolia* ont été prélevées sur des plantes croissant dans les conditions naturelles et elles ont été mises à germer sur du papier de filtre humide dans des caisses de Petri. Les méristèmes radiculaires ont été fixés au liquide de Navachine et ensuite enrobés à la paraffine. Les coupes transversales de ces méristèmes, d'une épaisseur de $15-18\mu$, ont été colorées au violet de gentiane.

En ce qui concerne l'étude de la méiose à la microsporangénèse, nous avons suivi la technique décrite par KÜPFER (1974).

Des inflorescences à l'état convenable ont été prélevées sur des plantes croissant aux endroits suivants: A - Terrain délimité par la route Coimbra - Penela et le chemin montant vers Alto do Lameiro; B - Terrain situé à gauche du chemin vers Alto do Lameiro; C - Réserve de la Sociedade Broteriana au Alto do Lameiro; D - Terrain voisin du bord de la route mentionnée ci-dessus, près du chemin qui amène à Casal dos Balaus; E - Terrain au voisinage du croisement vers Monforte; F - Pinède d'Almorós; et G - Leiria, Alto do Vieiro.

La fixation des boutons floraux a été faite sur le terrain à l'alcool-acétique 3:1 ou 4:1, additionné, pour chaque flacon de 20 cm^3 , d'une dizaine de gouttes de carmin acétique et de 3 gouttes d'acétate de fer (mordant). Toujours d'après KÜPFER (loc. cit.), le matériel fixé était conservé à la température ambiante pendant quelques semaines et placé après au congélateur. La coloration finale a été obtenue par macération au carmin acétique, suivie d'un chauffage modéré.

OBSERVATIONS

D'accord avec FERNANDES & LEITÃO (loc. cit.), nous avons dénombré 36 chromosomes (fig. text. 1a) dans les méristèmes radiculaires de quelques plantes. Ceux-ci sont assez petits et, par ce fait, nous n'avons pas réussi à observer les constriction cinétiques, ce qui nous a empêché d'établir le caryotype.

Les stades de la prophase de la méiose dans les cellules-mères du pollen jusqu'à la diacinèse sont d'une interprétation difficile par suite du nombre élevé et de la longueur des chromosomes. Cependant, nous avons constaté que des phénomènes de cytomixie étaient visibles au pachytène et au diplotène (Pl. I, fig. a). En ce qui concerne la nature et les possibles conséquences de ce phénomène, voir FERNANDES (1966) et DATTA & BISWAS (1984) et la bibliographie y citée.

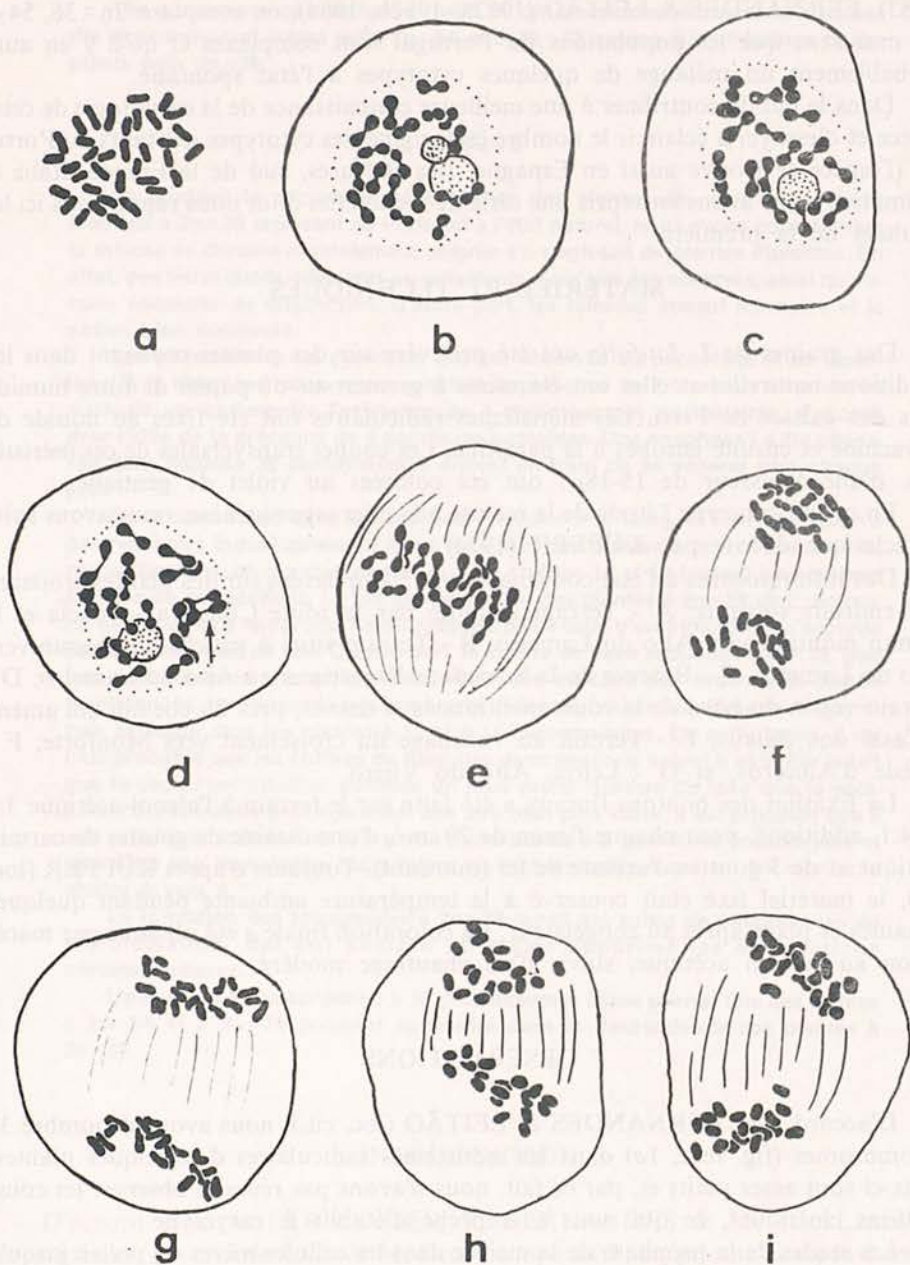


Fig. 1 — *a*, Plaqué équatoriale dans une cellule du méristème racinaire montrant 36 chromosomes. *b*, Diacynèse à 18 bivalents et à deux nucléoles en voie de fusion. *c*, *Idem*, montrant deux bivalents attachés au nucléole. *d*, *Idem*. La flèche indique une association qui pourra peut-être correspondre à un tétravalent. *e*, Métaphase I montrant 18 bivalents au plan équatorial. *f*, Anaphase I à 18 chromosomes s'avoisinant de chaque pôle. *g*, *Idem*. *h*, *Idem*. *i*, *Idem*. $\times 2000$.

À la diacinèse (figs. text. 1b, c, d et Pl. I, figs. b, c), nous avons dénombré 18 bivalents dont 2 étaient attachés au nucléole ou à deux nucléoles en voie de fusion (fig. text. 1b). L'analyse du nombre et de la distribution des chiasmata n'est pas facile, mais il semble qu'aux premiers stades de la diacinèse il y en aura quelques bivalents à deux chiasmata, la plupart ayant cependant un seul chiasma terminal. Vers la fin de la diacinèse, nous n'avons observé que des bivalents à un seul chiasma terminal. Des images pouvant être interprétées comme des tétravalents ont été trouvées quelquefois (fig. text. 1d), mais il nous a été impossible d'établir la présence certaine de ces associations de chromosomes.

À la métaphase I (fig. text. 1e, Pl. I, fig. d et Pl. II, figs. a, b), nous avons compté 18 petits bivalents à chiasma terminal, la présence de tétravalents, trivalents ou univalents n'ayant pas été mise en évidence.

La disjonction anaphasique est régulière avec la séparation de 18 chromosomes vers chaque pôle (figs. text. 1f, g, h, i et Pl. II, figs. a, b, c). Une anaphase I exceptionnelle à 36 chromosomes se séparant vers chaque pôle a été trouvée (fig. text. 2a).

Beaucoup de télophases I ont été observées (figs. text. 2b, c et Pl. III, figs. a, b, c) nous permettant dénombrer 18 chromosomes, ainsi qu'un ou deux nucléoles. Lorsqu'il y avait deux nucléoles dans chacun des noyaux, le phénomène de la symétrie nucléolaire (DE SMET, 1914 et voir aussi HEITZ, 1931a, b) a été observé (fig. text. 2b).

La métaphase II s'ensuit (figs. text. 2d, e, f, Pl. III, fig. c et Pl. IV, figs. a, b, c), ayant lieu avec la plus grande régularité, le même arrivant en ce qui concerne l'anaphase II (Pl. V, figs. a, b) et la télophase II (Pl. V, figs. a, b).

D'accord avec la régularité observée, nous avons constaté que les tétrades étaient normales (Pl. V, fig. c) dépourvues de micronoyaux et que les noyaux montraient soit un, soit deux nucléoles (fig. text. 2g). D'autre part, nous avons vérifié que les grains de pollen étaient aussi normaux n'ayant pas observé jusqu'à présent des grains avortés. Les grains (Pl. VI, figs. a, b, c) sont 6-colpés, les régions entre les colpes à surface réticulée et l'exine semble traversée par de nombreuses perforations.

La technique employée met en évidence le noyau générateur d'une façon assez nette, dans lequel un gros nucléole se montre (Pl. VI, figs. a, b).

DISCUSSION

CHAYTOR (1937) range les espèces du genre *Lavandula* L. dans 5 sections⁽¹⁾, dont la constitution est la suivante (après le nom de chaque espèce figurent entre parenthèses les nombres des chromosomes somatiques qui leur ont été attribués)⁽²⁾:

⁽¹⁾ La section *Spica* doit à présent s'appeler *Lavandula* d'accord avec le Code International de la Nomenclature Botanique.

⁽²⁾ Outre les nombres colligés par FEDEROV (1974), nous mentionnons ceux parus après la publication de cet *Index* dans les travaux des auteurs suivants: LARSEN (1960), BORGÉN (1969, 1970), GUINEA (1972), VAN LOON (1974), KÜPFER (1974), NATARAJAN (1978), CAPINERI, D'AMATO & MARCHI (1978), FERNANDES & LEITÃO (1982a, 1984) et QUEIRÓS (1983).

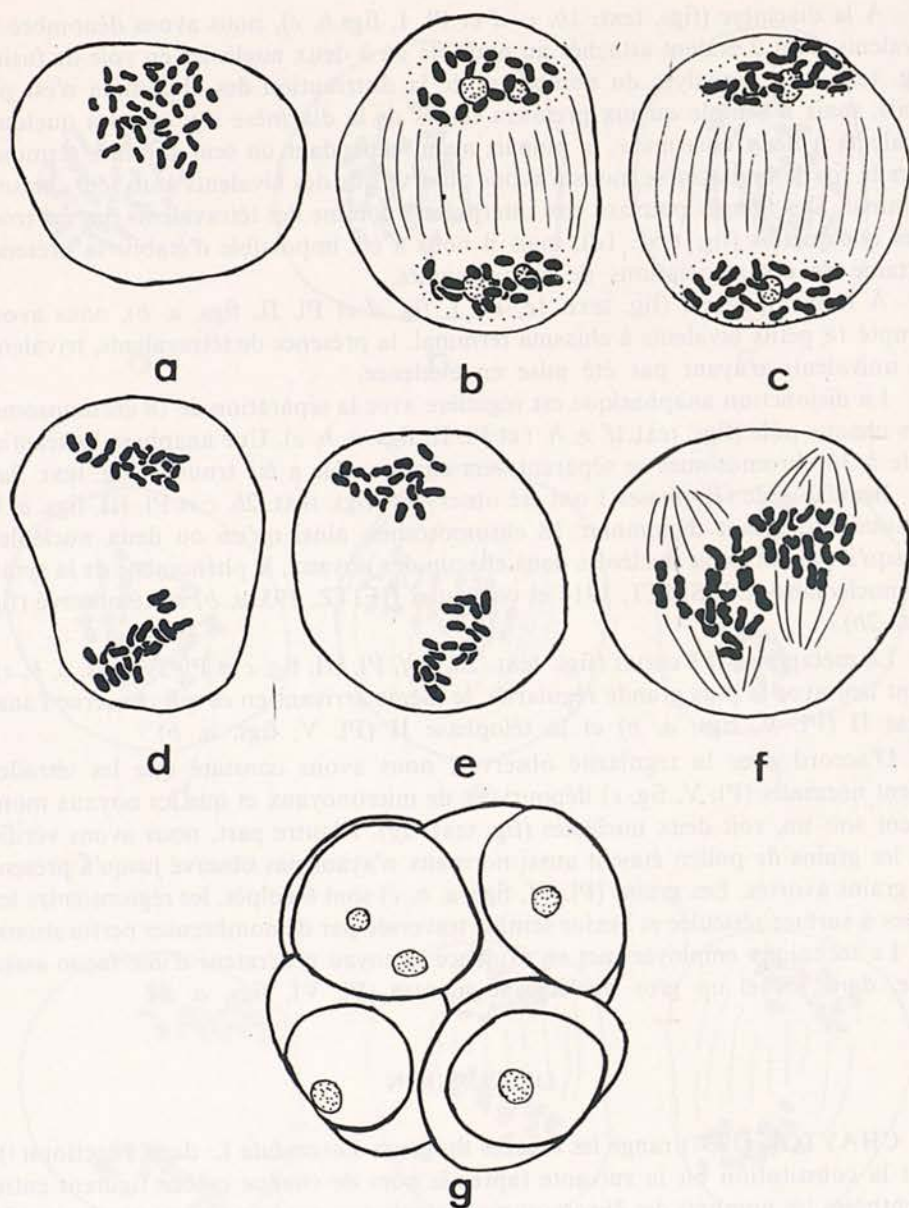


Fig. 2—*a*, Moitié d'une anaphase I montrant 36 chromosomes. *b*, Télaphase I où se distinguent 18 chromosomes et deux nucléoles à chaque pôle; remarquer la symétrie nucléolaire. *c*, *Idem*, mais montrant un seul nucléole. *d* et *e*, Métaphases de la deuxième division dans lesquelles les fuseaux ne sont pas représentés. *f*, Métaphase de la deuxième division montrant les fuseaux. *g*, Jeune tétrade dont un des noyaux montre deux nucléoles. $\times 2000$.

Sect. I—*Stoechas* Ging.: 1. *L. dentata* L. (44, 45); 2. *L. stoechas* L. (30); 3. *L. viridis* L. Hérit. (30); 4. *L. pedunculata* Cav. (30).

Sect. II—*Lavandula* : 5a. *L. angustifolia* Miller subsp. *angustifolia* (comprenant *L. spica* L., *L. officinalis* Chaix. et *L. vera* DC.) (36, 48, 50, 54); 5b. *L. angustifolia* subsp. *pyrenaica* (DC.) Guinea (50); 6. *L. latifolia* Medicus (36, 50, 54, 75); 7. *L. lanata* Boiss. (50, 54).

Sect. III—*Pterostoechas* Ging.: 8. *L. multifida* L. (22, 24); 9. *L. mairei* Humbert (24); 10. *L. maroccana* Murb. (24); 11. *L. canariensis* Miller (22); 12. *L. antennae* Maire (48); 13. *L. brevidens* (Humbert) Maire(?)⁽³⁾; 14. *L. tenuisecta* Cosson ex Ball sensu str. (?); 15. *L. pubescens* Decaisne (?); 16. *L. stricta* Delile (22); 17. *L. somaliensis* Chaytor (?); 18. *L. pinnata* L.f. (22); 19. *L. foliosa* Christ. (?); 20. *L. minutolii* Bolle (22); 21. *L. rotundifolia* Bentham (?); 22. *L. atriplicifolia* Bentham (?); 23. *L. sublepidota* Rech. f. (?)⁽⁴⁾.

Sect. IV—*Chaetostachys* Bentham: 24. *L. gibsonii* Grah. (?); 25. *L. bipinnata* Kuntze (?).

Sect. V—*Subnuda* Chaytor; 26. *L. subnuda* Bentham (?); 27. *L. macra* Baker (?); 28. *L. nimmoi* Bentham (?); 29. *L. setifera* Anders. (?)⁽⁵⁾

D'après ce relevé, on constate que la sect. *Stoechas* se caractérise par le chiffre de base $X_2 = 15$ (le nombre $2n = 44$ rapporté par *Flora Europaea* pour *L. dentata* pourra correspondre à une forme hypotriploïde) et la sect. *Pterostoechas* par $X = 6$ (le chiffre 22 correspondrait à des plantes hypotétraploïdes), tandis qu'on ne connaît encore aucun nombre chromosomique chez les deux dernières sections (voir cependant notre note 5). Quant à la sect. *Lavandula*, on constate qu'il y a deux candidats, les chiffres 6 et 9, problème qu'il faut éclaircir.

Le fait le plus saillant mis en évidence par les observations menées à bout chez les plantes de *L. latifolia* à $2n = 36$ est certainement celui de la régularité de leur méiose. En effet, nous avons constaté que les plantes examinées engendrent 18 bivalents dont les éléments constitutifs se séparent normalement vers les pôles, que la deuxième division est aussi régulière, que les tétrades n'ont pas montré des micronoyaux et que le pollen est bien conformé. Les plantes se comportent donc comme des diploïdes. Ces faits nous autorisent alors à penser que le chiffre de base de la sect. *Lavandula* pourra être 18, d'autant plus que des plantes à $2n = 18$ ne sont pas connues.

En ce qui concerne la sect. *Pterostoechas*, nous pourrions raisonner d'une façon semblable, en admettant que le chiffre de base est 12 au lieu de 6, une fois que des

⁽³⁾ Signalées d'un point d'interrogation les espèces dont les nombres chromosomiques n'ont pas été encore déterminés.

⁽⁴⁾ Espèce du sud de la Perse décrite récemment par K.H. RECHINGER (1979).

⁽⁵⁾ MEHRA & GILL (1972) rapportent l'existence en Inde (Gulmarg, alt. 2100 m) d'une plante qu'ils ont déterminée comme *L. spica* Df. [d'après NATARAJAN (1977) le nom Df. résulterait d'une erreur typographique pour DC., opinion que nous partageons] et dans laquelle ils ont compté $2n = 12$. Il ne s'agit certainement pas de *L. angustifolia* Miller qui habite dans la région méditerranéenne. Étant donné que l'aire géographique de la sect. *Chaetostachys* correspond à l'Inde, il est probable que nous étions en présence d'une espèce déjà décrite ou d'une espèce nouvelle de cette section. De quelque façon, la trouvaille est intéressante, puisqu'elle pourra montrer que le chiffre de base de la sect. *Chaetostachys* est 6, comme celui de la sect. *Pterostoechas*.

plantes à $2n=12$ ne sont pas aussi connues. Cependant, étant donné que cette section est constituée par plusieurs espèces polymorphes et que quelques unes n'ont pas encore été étudiées du point de vue caryologique, nous considérons probable que des plantes à $2n=12$ seront encore rencontrées au moyen d'une étude caryologique plus poussée. La rencontre en Inde de plantes à $2n=12$ par MEHRA & GILL (1972), appartenant probablement à la sect. *Chaetostachys*, est d'accord avec cette idée (voir la note 5).

Alors, pour expliquer l'origine du nombre de base 18 chez la sect. *Lavandula*, nous pourrions penser à l'existence d'une espèce primitive de la sect. *Pterostoechas* à $2n=12$ qui, par mutation, altérations structurelles, etc., aurait donné naissance à un petit nombre d'autres espèces au même nombre chromosomique. Une espèce, par exemple A, pourrait s'hybrider avec une autre, B, en engendrant l'hybride $6A+6B$. Cet hybride produirait des gamètes non réduits qui, par fécondation entre eux, donneraient naissance à des plantes $12A+12B$, c'est-à-dire, des amphidiploïdes à méiose régulière et par conséquent stables et fertiles. Ces amphidiploïdes, plus vigoureux que les diploïdes, finiraient pour éliminer ceux-ci et on comprendrait ainsi que ces plantes n'existeront plus à ce jour.

Des gamètes non réduits de l'hybride $6A+6B$ pourraient se croiser aussi avec une autre espèce diploïde, C, d'où résulteraient des plantes à constitution $6A+6B+6C$, c'est-à-dire à 18 chromosomes. Celles-ci, au moyen de la formation et respective fusion de gamètes mâles et femelles non réduits, donneraient naissance à des plantes $12A+12B+12C$, qui posséderaient 36 chromosomes et seraient des hexaploïdes à base 6. Par suite de l'existence de deux garnitures de chacune des espèces A, B et C, les plantes présenteraient une méiose normale à 18 bivalents, comme il arrive chez les plantes que nous avons étudiées. Le mécanisme préconisé ici explique l'absence de plantes à 18 chromosomes, puisque celles-ci seraient des hybrides stériles, incapables de se maintenir à l'état naturel.

Cependant, cette hypothèse de considérer les plantes à $2n=36$ comme ayant la constitution $12A+12B+12C$ se heurte à beaucoup de difficultés quand on pense que le chiffre de base 18 devra permettre l'explication de l'apparition des autres chiffres rapportés jusqu'à ce jour, en particulier 50 et 54. En effet, en ce qui concerne 50 nous aurons besoin de nous adresser au nombre 48 et de le dériver de celui-ci. Le chiffre 48 pourrait résulter de $36+12$ et, par ce fait, il faudrait recourir à une autre plante à 24 chromosomes, qui amènerait à une forme à constitution $12A+12B+12C+12E$, qui aurait une méiose régulière. Cette plante, par non-disjonction, engendrait des gamètes à 25 chromosomes qui, par leur rencontre, produiraient des plantes à $2n=50$. Le processus est complexe, mais il est possible. Quant au chiffre 54, il pourrait résulter de $36+18$ et la plante aurait par exemple la constitution $12A+12B+12C+6A+6B+6C$, c'est-à-dire, chacune des garnitures serait en triple et la plante aurait un comportement de triploïde. Or, en considérant ce que nous savons déjà de la méiose de ces plantes, tel n'arrive pas. D'autre part, GARCIA (1942) admet que le chiffre de base secondaire $X_2=15$, caractéristique de la sect. *Stoechas* a résulté du croisement entre des plantes de la sect. *Pterostoechas* à $X=6$ et de la sect. *Lavandula* à $X=9$. Si nous considérons que le nombre de base des deux sections est le même, c'est-à-dire 6, les plantes à $2n=30$ ne pourraient

résulter que du croisement $18 + 12$ ($6A + 6B + 6C + 12E$), ce qui ne s'accorde pas avec la régularité de la méiose dans la sect. *Stoechas*.

Une autre hypothèse serait celle d'admettre que les deux sections possèdent 6 comme nombre de base et que le processus évolutif a été mené par autopolyploidie accompagné de diploïdisation des garnitures réunies. En nous adressant aussi aux cas qui ont été examinés dans l'hypothèse antérieure, nous constatons que l'apparition de $2n = 50$ trouve ici une explication analogue, mais les plantes à $2n = 54$ seraient des 9-ploïdes et celles à 30 pentaploïdes.

Il semble donc que le chiffre de base de la sect. *Lavandula* ne sera pas 6. L'hypothèse alternative sera celle de considérer les plantes à $2n = 36$ et à $2n = 54$, respectivement, comme des tétraploïdes et des hexaploïdes à base 9. Nous aurions donc, d'accord avec GARCIA (1942) et FERNANDES & LEITÃO (1984), les nombres de base 6, caractéristique de la sect. *Pterostoechas*, et 9 de la sect. *Lavandula*. Étant donné que ces deux sections sont prochainement apparentées, deux hypothèses pourront être envisagées: 6 aurait engendré 9 ou 9 aurait produit 6. Dans le but de résoudre cette question, il faut établir quel est de ces deux chiffres celui qui a la plus grande probabilité d'être le primitif. Par le fait que la sect. *Pterostoechas* est celle qui possède le plus grand nombre de taxa et occupe l'aire la plus vaste (région méditerranéenne — exception des Balkans et de l'Asie Mineure —, Iran, Afrique Tropicale du Nord depuis la Somalie jusqu'à la Nigéria et les îles atlantiques tropicales et tempérées⁽⁶⁾), il est probable que 6 soit le primitif et qu'il aurait engendré 9 correspondant à la sect. *Lavandula*, constituée seulement par 3 espèces limitées dans leur distribution à la région centrale du Portugal, SE et E de l'Espagne, îles Baléares, Pyrénées orientales, sud de la France, Suisse occidentale, Italie du Nord et Centrale, Corse, Sicile, Istrie et Dalmatie⁽⁷⁾).

Alors les choses pourraient avoir eu lieu de la façon suivante: Une espèce à $n = 6$, disons A, pourrait s'hybrider avec une autre, B, au même nombre de chromosomes. Par suite de l'irrégularité de la méiose, l'hybride pourrait produire des gamètes non réduits, $6A + 6B$, qui pourraient être fécondés par des gamètes réduits de l'espèce A par exemple. Par ce processus, une plante à constitution $12A + 6B$ prendrait naissance.

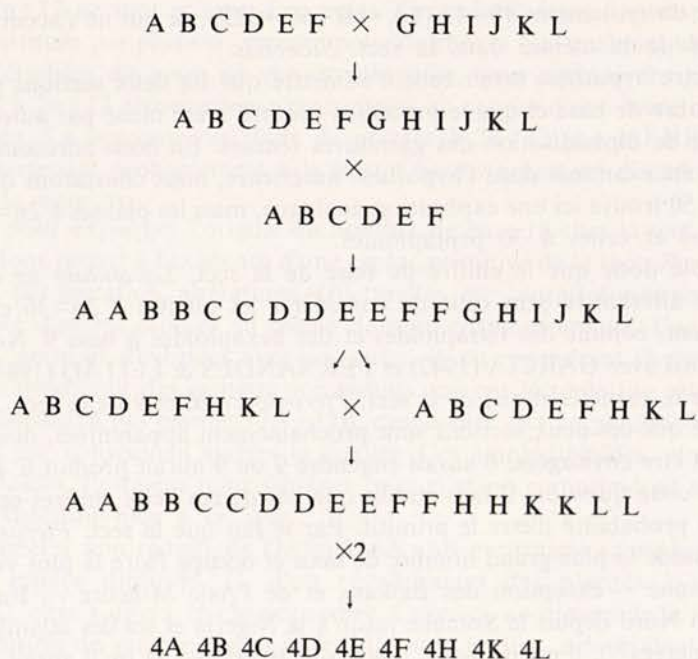
La méiose serait irrégulière, avec la formation de 6 bivalents et 6 univalents. Trois éléments de ceux-ci pourraient être inclus dans un même noyau et des gamètes à 9 chromosomes résulteraient. La rencontre de deux gamètes du même type produirait des formes à 18 chromosomes. La production de gamètes non réduits mâles et femelles par ces plantes et respective fusion amènerait à d'autres à $2n = 36$.

Le mécanisme envisagé peut mieux se comprendre au moyen du schéma suivant, dans lequel les chromosomes correspondent à des lettres et où nous ne considérons qu'un des gamètes possibles produits par le deuxième hybride:

⁽⁶⁾ D'après CHAYTOR (1937) et K.H.RECHINGER (1979).

⁽⁷⁾ D'après CHAYTOR (1937).

Il faut remarquer que des taxa appartenant à ce qui auparavant était connu sous les noms de *L. officinalis*, *L. spica* et *L. vera* ont été souvent cultivés et qu'ils se sont échappés des cultures à quelques endroits. De cette façon, il est difficile de tracer à ce jour l'exacte distribution géographique de cette section.



Il y en aurait ainsi une aneuploïdie ascendente menant de 6 à 9. La formation d'une plante de ce type aurait eu lieu de très bonne heure et un processus de diploïdisation de ce tétraploïde s'ensuivrait, de telle façon que les descendants actuels se comportent comme des diploïdes. La petite longueur des chromosomes pourra peut-être avoir aussi quelque rapport avec la basse ou nulle formation d'associations chromosomiques.

Bien qu'à présent nous admettons que le chiffre de base 9 chez la sect. *Lavandula* est plus probable que 6, nous ne pouvons pas encore considérer ce problème résolu. En effet, dans le but d'essayer à l'éclaircir, nous devons finir les recherches que nous avons en cours: recensement des nombres chromosomiques des populations et étude de la méiose chez les plantes à $2n=50$ et 54 , ainsi que chez d'autres pourvues d'autres nombres qui pourront encore apparaître.

Nos observations ont montré l'existence de rares anaphases I à 36 chromosomes, mais nous n'avons pas mis en évidence le mécanisme amenant à ce type de cellules. Cependant, nous pourrions penser à la présence dans le tissu sporogène de cellules à 72 chromosomes engendrées par endomitose, qui donneraient origine à des anaphases I de ce type. L'apparition de ces anaphases laisse prévoir l'existence de plantes à 54 et à 72 chromosomes dans les populations de *L. latifolia*.

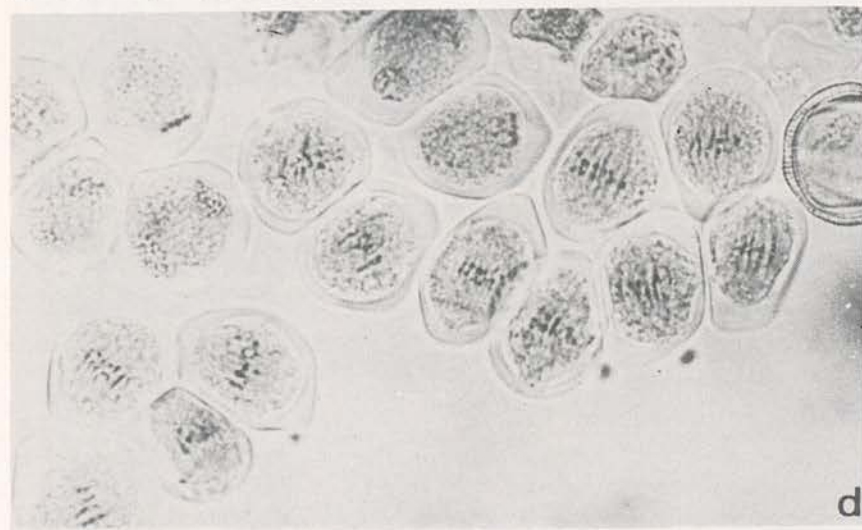
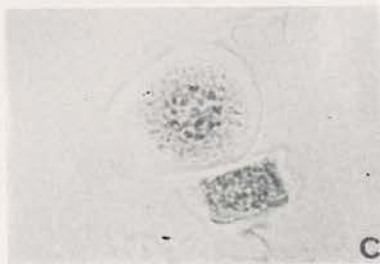
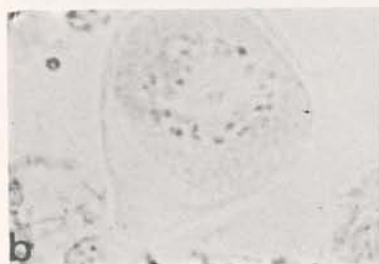
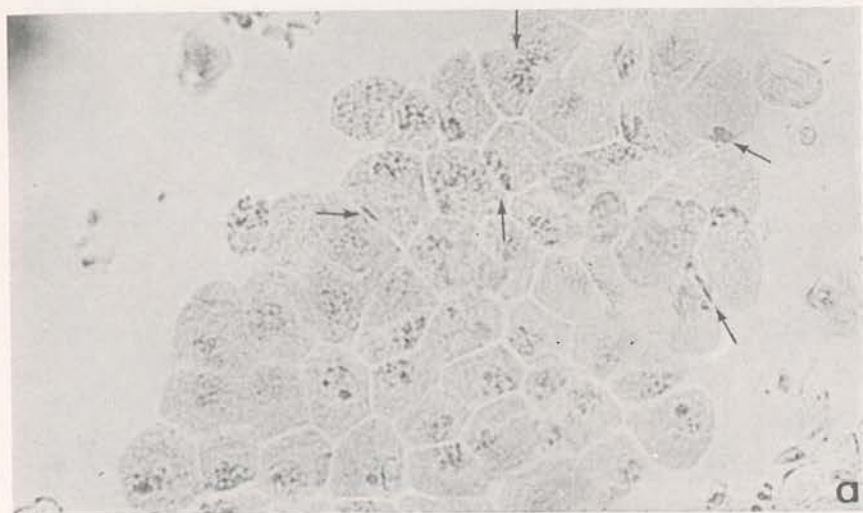
REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement les techniciens de l'Institut Botanique de Coimbra, MM. JORGE ALBERTO MASCARENHAS, ALEXANDRINO DE MATOS, MANUEL CARDOSO ALVES, ARLINDO CARDOSO et AGOSTINHO PIMENTA de l'aide qu'ils ont bien voulu nous accorder dans l'élaboration de ce travail.

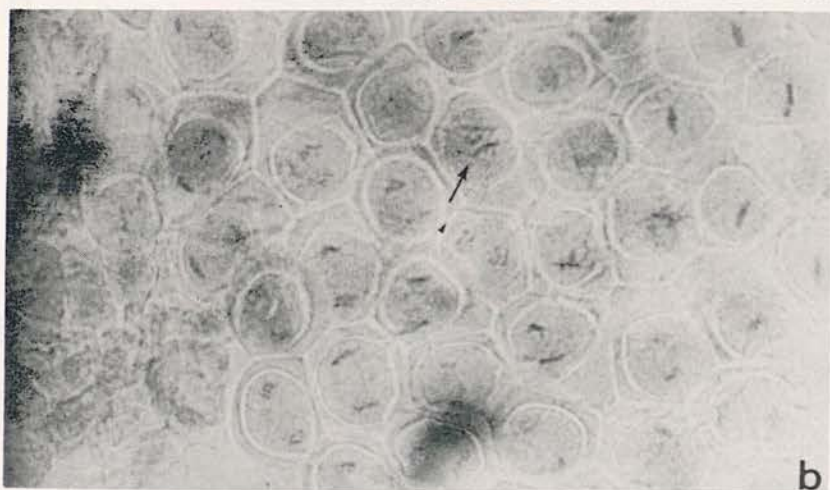
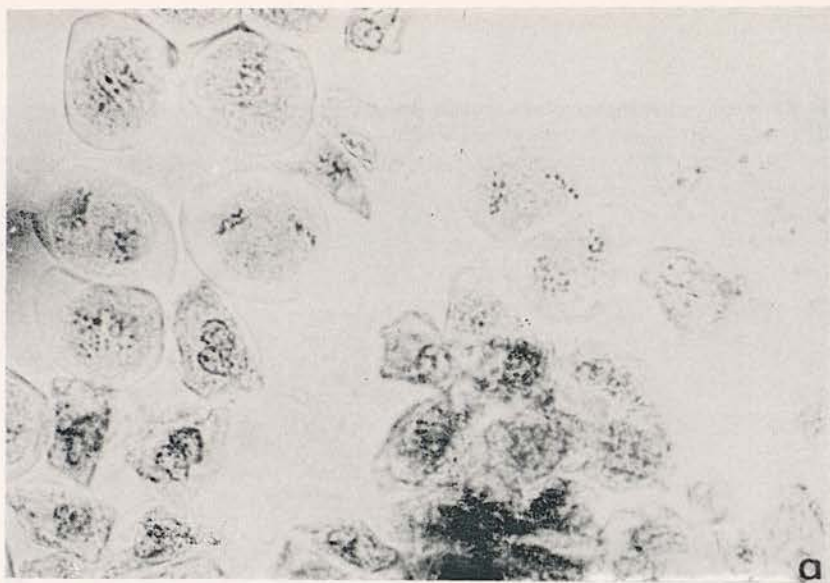
BIBLIOGRAPHIE

- BORGEN, L. (1969)—Chromosome numbers of vascular plants from the Canary Islands, with special reference to the occurrence of polyploidy. *Nytt. Mag. Bot.* **16**: 81-121.
- (1970)—Chromosome numbers of Macaronesian flowering plants. *Nytt. Mag. Bot.* **17**: 145-161.
- CAPINERI, R.; D'MATO, G. & MARCHI, P. (1978)—Numeri cromosomici per la flora italiana: 534-583. *Inf. Bot. Ital.* **10**(3): 421.
- CHAYTOR, D.A. (1937)—A taxonomic study of the genus *Lavandula* L. *Journ. Linn. Soc. London*, **51**: 153-204.
- DATTA, A.K. & BISWAS, A.K. (1984)—Cytomixis and a trisomic in *Nigella sativa* L. *Cytologia* **49**: 437-445.
- FEDEROV, A.A. (1974)—*Chromosome numbers of flowering plants*. Otto Koeltz, Sci. Publ.
- FERNANDES, A. (1966)—Nouvelles études caryologiques sur la section *Jonquilla* DC. du genre *Narcissus* L. *Bol. Soc. Brot.*, 2.^a sér., **40**: 207-261.
- FERNANDES, A. & LEITÃO, M.T. (1982a)—Contribuição para o conhecimento cariológico das *Lamiaceae* de Portugal. Programa y Resúmenes de las XVIII Jornadas Luso-Espanolas de Genética. Granada 21 a 23 Setembro: 150-151.
- (1982b)—Mecanismos evolutivos na família das *Lamiaceae*. *Mem. Acad. Ciênc. Lisboa, Cl. Ciênc.*, **24**: 331-351.
- (1984)—Contribution à l'étude cytotaxinomique des *Spermatophyta* du Portugal. XVIII — *Lamiaceae*. *Mem. Soc. Brot.* **27**: 27-75.
- FERNANDES, A.; FERNANDES, R. & ALMEIDA, M.T. (sous presse)—*Lavandula latifolia* Medicus: a reserve of wild-genes established by Sociedade Broteriana near Coimbra. International Symposium on Conservation of Genetic resources of Aromatic and Medicinal Plants. Oeiras, May 9-11, 1984.
- GARCIA, J.G. (1942)—Contribuição para o estudo cário-sistemático do género *Lavandula* L. *Bol. Soc. Brot.* 2.^a sér. **16**: 183-193.
- GUINEA, E. (1972)—*Lavandula* L. in *Fl. Eur.* **3**: 187-188.
- HEITZ, E. (1931a)—Die Ursache der gesetzmässigen Zahl, Lage, Form und Grosse pflanzlicher Nucleolen. *Planta*, **12**: 774-844.
- (1931b)—Nucleolen und Chromosomen in der Gattung *Vicia*. *Planta*, **15**: 495-505.
- KÜPFER, PH. (1974)—Recherches sur les liens de parenté entre la flore orophile des Alpes et celle des Pyrénées. *Boissiera*, **23**: 1-322.
- LARSEN, K. (1960)—Cytological and experimental studies on the flowering plants of the Canary Islands. *Biol. Skr. Dan. Vid. Selsk.* **11**(3).
- MEHRA, P.N. & GILL, L.S. (1972)—Cytology of West Himalayan Labiatae: Tribe *Ocimoideae*. *Cytologia*, **37**:53-57.
- MATARAJAN, G. (1977)—Contribution à l'étude caryosystématique des espèces de la Garrigue languedocienne. Thèses, Académie de Montpellier, France.

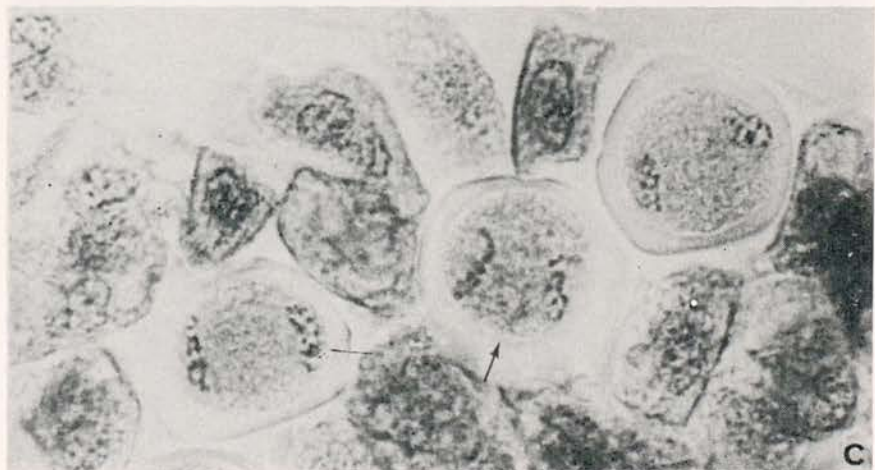
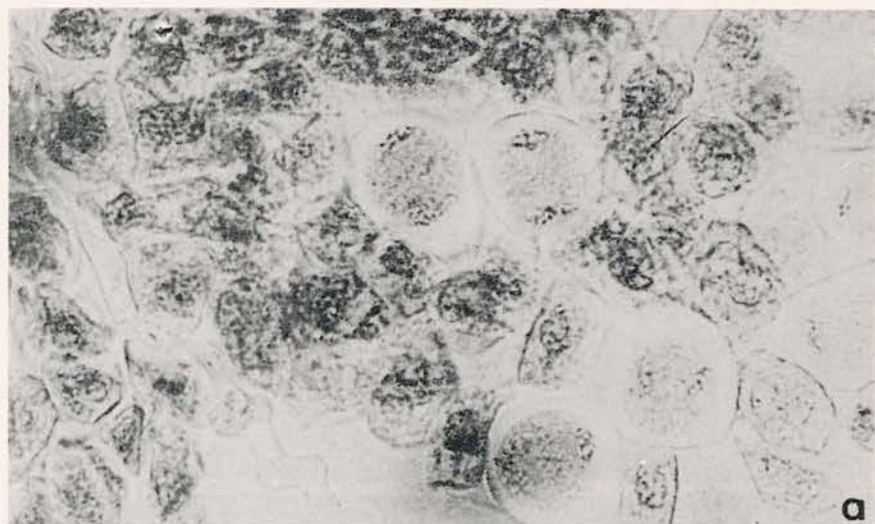
- _____ (1978)—In LOVE IOPB Chromosome numbers Reports LXII. *Taxon*, 27: 531.
- QUEIRÓS, M. (1983)—Notas cariológicas em *Labiatae* portuguesas. *Bol. Soc. Brot.*, 2.^a sér. 56: 71-77.
- RECHINGER, K.H. (1979)—*Labiatae* novae iranicae. *Pl. Syst. Evol.* 133(1-2): 105-108.
- SMET, E. DE (1914)—Chromosomes, prochromosomes et nucléoles dans quelques Dicotylées. *La Cellule*, 29: 335-377.
- VAN LOON, J. CHR.(1974)—A cytological investigation of flowering plants from the Canary Islands. *Acta Bot. Neerl.* 23: 113-124.



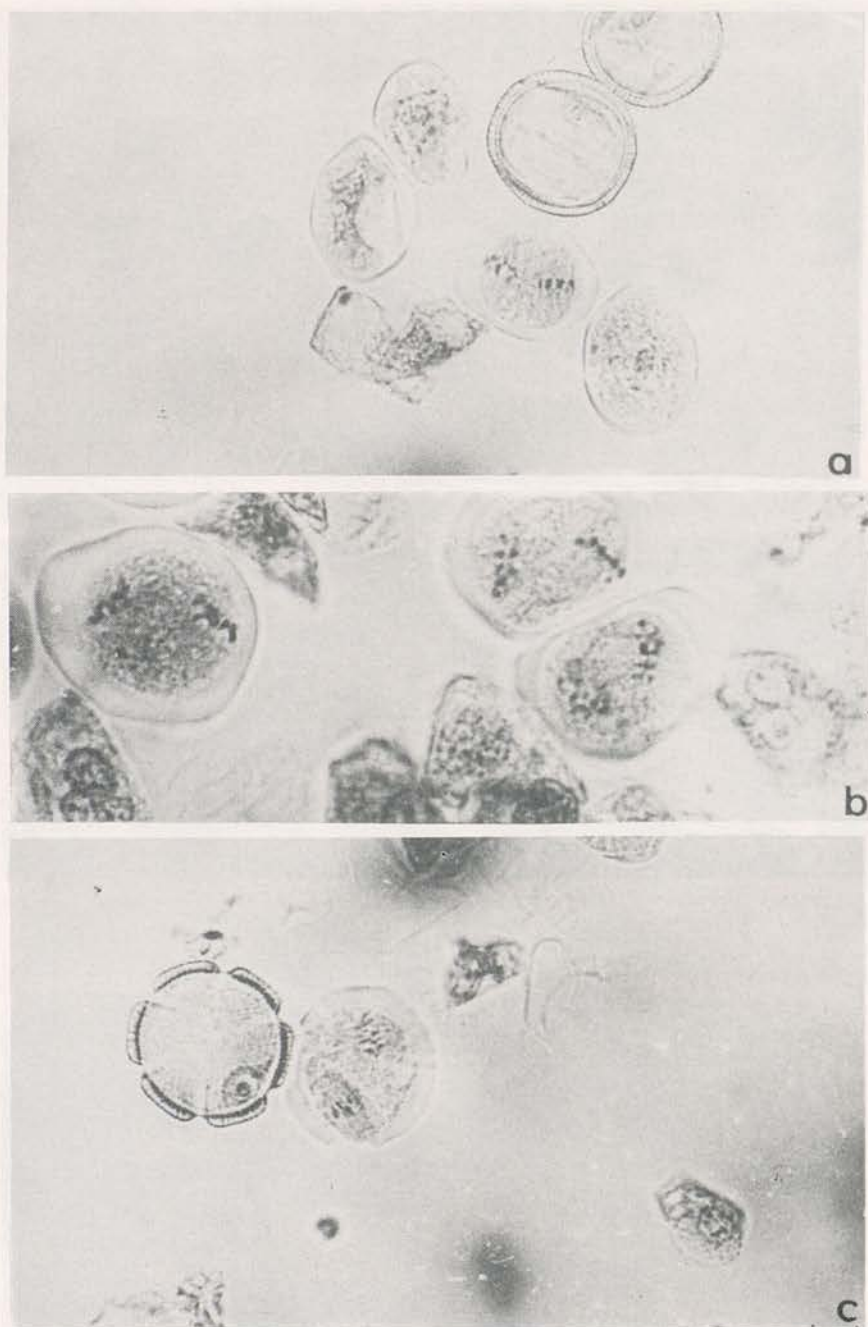
Pl. I—*a*. Cellules-mères du pollen au pachytène-diplotène, montrant des phénomènes de cytotoxicité (flèches). $\times 400$. *b*. Cellule-mère du pollen au début de la diacinèse. $\times 900$. *c*. *Idem* à la diacinèse. $\times 900$. *d*. Cellules-mères du pollen à la métaphase I, anaphase I et télophase I. $\times 600$.



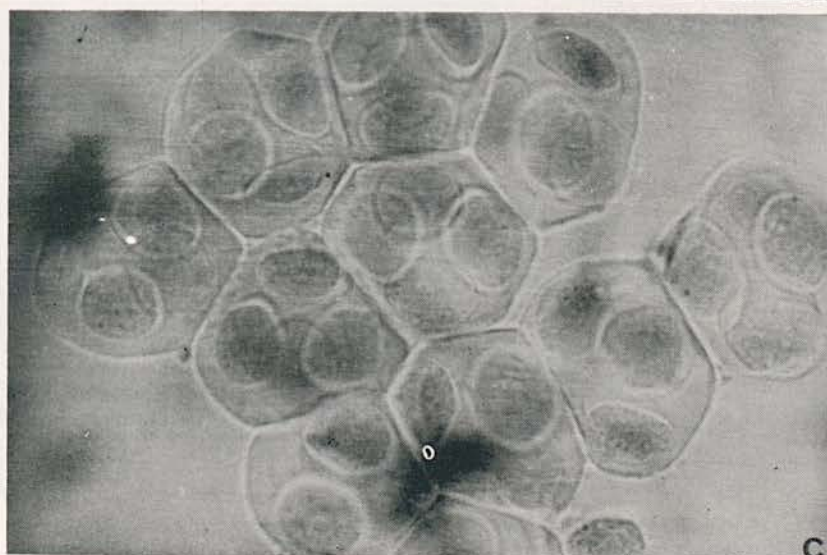
Pl. II — *a*, Cellules-mères du pollen à la métaphase I et à l'anaphase I. $\times 600$. *b*, *Idem*. La flèche indique une cellule au début de la disjonction à l'anaphase I. $\times 240$. *c*, La même cellule de la photo antérieure (flèche) à un plus fort grossissement. $\times 500$.



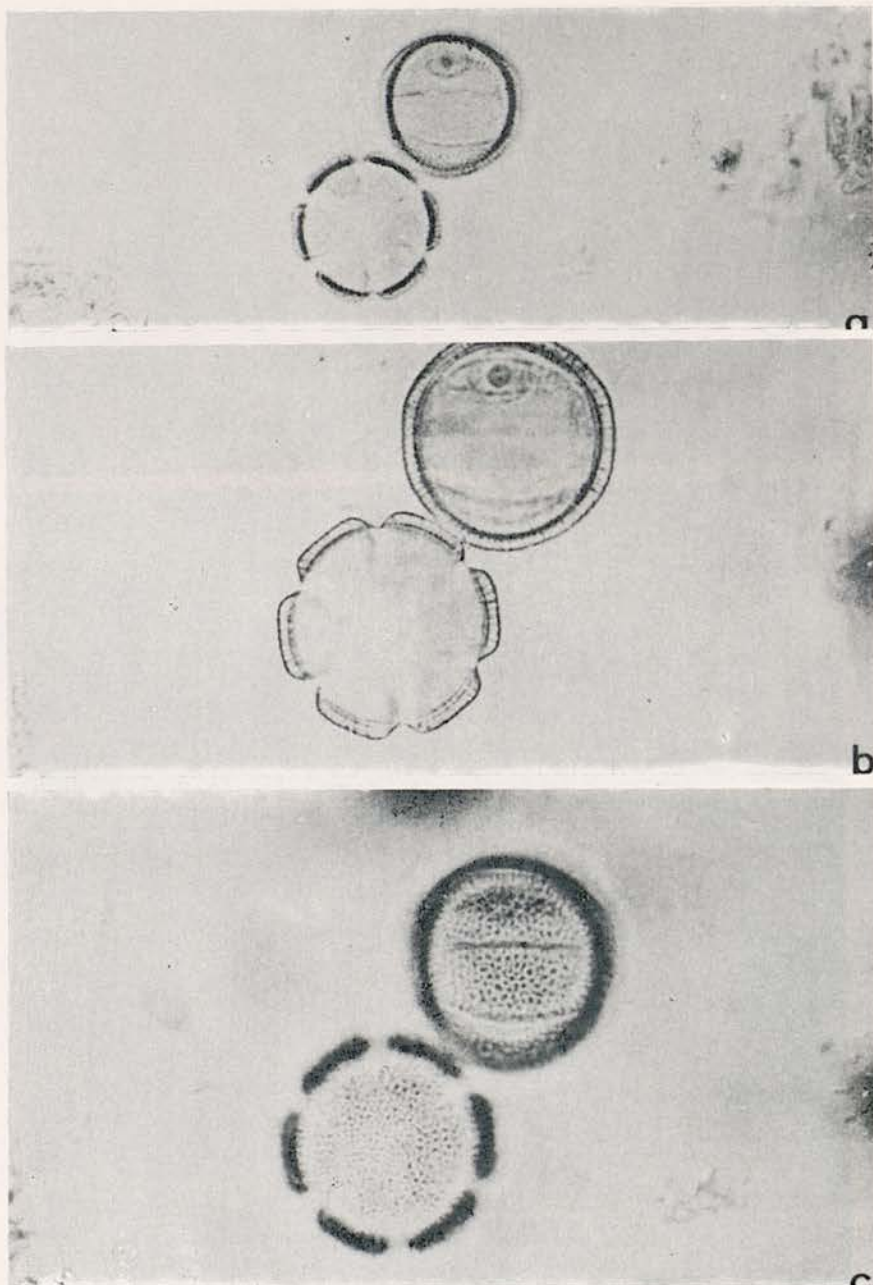
Pl. III — *a*, Cellules-mères du pollen à la télophase I. $\times 600$. *b*, *Idem* à un plus fort grossissement. $\times 900$. *c*, *Idem*. La flèche indique une cellule à la métaphase II. $\times 900$.



Pl. IV — *a*, Cellules-mères du pollen au début de la diacynèse et à la métaphase II. Remarquer aussi la présence de deux grains de pollen. $\times 600$. *b*, *Idem* à la métaphase II. $\times 900$. *c*, Cellule-mère à la métaphase II et un grain de pollen 6-colpé, montrant le noyau générateur. $\times 600$.



Pl. V — *a*, Cellules-mères du pollen à l'anaphase et à la télophase II. $\times 400$. *b*, *Idem* à un plus fort grossissement, $\times 900$. *c*, Tétrades normales. $\times 500$.



Pl. VI — *a*, Deux grains de pollen dont un (au-dessus) pas encore complètement développé en vue équatoriale et l'autre (au-dessous) complètement développé, 6-colpé, en section médiane de la vue polaire. Remarquer le noyau générateur dans le premier grain. $\times 600$. *b*, Les mêmes deux grains de pollen de la fig. *a* à un plus fort grossissement; remarquer les perforations de la paroi. $\times 900$. *c*, *Idem* montrant la surface des parois. $\times 900$.

RELATEDNESS OF BACTERIOPHAGES PBS1, AR9, 3NT AND I10 OF BACILLUS SUBTILIS

Graça A. Vieira*, Herminia de Lencastre** and Luis J. Archer**

Laboratório de Genética Molecular, Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal, * Faculdade de Ciências de Lisboa and ** Universidade Nova de Lisboa, Portugal

RESUMO

O bacteriófago PBS1 é o fago correntemente utilizado no mapeamento grosseiro do cromossoma de *Bacillus subtilis*. No mesmo grupo de PBS1 estão incluídos os fagos AR9, 3NT e I10 (ACKERMANN 1974).

Utilizando diferentes estirpes de *Bacillus* compararam-se as eficiências de adsorção dos quatro fagos.

Fez-se também o estudo da sua resistência a alguns agentes físicos e químicos.

Determinou-se a densidade das partículas fágicas em gradientes de cloreto de cézio.

Usando enzimas de restrição digeriram-se os DNAs dos quatro bacteriófagos. Os padrões de restrição obtidos para os quatro DNAs com a enzima Hha I mostram que os bacteriófagos PBS1, 3NT, I10 e AR9 não são idênticos, apesar de todas as semelhanças apresentadas.

INTRODUCTION

Although bacteriophage PBS1 is widely used in the gross mapping of the *Bacillus subtilis* chromosome, the characterization of other phages of the same group (AR9, 3NT and I10) has not been explored.

In this paper we compare the four bacteriophages with respect to adsorption efficiency, resistance to several physical and chemical agents, buoyant density of the phage particles in CsCl gradients and restriction pattern of their DNAs.

MATERIAL AND METHODS

Bacteria and phages

The strains used in this study and their sources are described in table I.

TABLE I

BACTERIA	GENOTYPE	SOURCE	REFERENCES
<i>B. subtilis</i> 168	prototroph	F.E. Young	
BR 151	<i>metB</i> 10 <i>lys</i> -3 <i>trpC</i> 2	F.E. Young	
QB 943	<i>pyrD</i> 1 <i>ilvA</i> 1 <i>thyB</i> 1 <i>trpC</i> 2	R.A. Dedonder	Dedonder <i>et al.</i> , 1977
1A 153	<i>trpC</i> 2 <i>flaB</i> 2 <i>lys</i>	BGSC collection	Grant & Simon, 1969
1A 312	<i>argC</i> 4 <i>flaC</i> 51 <i>hag</i> -1 <i>hisA</i> 1 <i>ura</i>	BGSC collection	Grant & Simon, 1969
1A 459	<i>metB</i> 5 <i>thr</i> -5 <i>leuA</i> 8 SP β ^s	BGSC collection	Zahler <i>et al.</i> 1977
1L 11	<i>trpC</i> 2 (ϕ 105)	BGSC collection	Rutberg, L., 1969
CU 1444	<i>thyA</i> 1 <i>thyB</i> 1 <i>ilvA</i> 2 <i>pyrD</i> 1 SP β ^s	S.A. Zahler	Zahler <i>et al.</i> , 1977
IGCg 240	<i>thyA</i> 1 <i>thyB</i> 1 <i>ilvA</i> 2 <i>pyrD</i> 1 SP β ^s (ϕ 105)	CU 1444, lysogenic for ϕ 105, our laboratory	
<i>B. pumilus</i> 8A1	prototroph	BGSC collection	
PHAGES			
PBS1	virulent	C. Anagnostopoulos	Takahashi, 1961
AR9	virulent	P.J. Piggot	Belyaeva & Azizbekyan, 1967
3NT	virulent	H.Y. Steensma	Ivanovics & Csiszar, 1962
110	virulent	H.Y. Steensma	Rima & Steensma, 1971
ϕ 105	temperate	induced by mit. C. from 1L11	Reilly, 1965

Media

The liquid minimal medium was MM (ANAGNOSTOPOULOS & SPIZIZEN 1961) solidified with 1.7% agar when used as a selective plating medium. The liquid rich media used for growing the bacteria was PAB (Penassay Broth) or BHI (Brain Heart Infusion) supplemented with 0.5% YE (Yeast Extract). Bottom layer and soft agar for plating phages were TBAB (Tryptose Blood Agar Base) and TBAB 1% agar.

Resistance Tests

All resistance tests were performed using standard methodology (ACKERMANN *et al.* 1978).

Adsorption Tests

Overnight cultures were diluted (1:50) on PAB+YE and incubated at 37°C with heavy aeration. At O.D. 600=0.4 the cultures were infected at a multiplicity of infection (moi) of 10⁻². Infection mixtures were incubated with moderate aeration

at the same temperature in a waterbath shaker for 5 minutes, then diluted (1:100) in TM (KAWAMURA *et al.* 1979) and incubated other 10 minutes in the same conditions. The samples were centrifuged at $7000 \times g$ and the amount of unadsorbed phages was determined from the plaque forming units in the supernatant.

The adsorption tests using the TS strains (fla⁻) 1A153 and 1A312 were performed as described, but cultures were growing both at 37 and 46°C.

Buoyant density of phage particles

To label AR9, 3NT and I10 with [³H] uridine, *B. subtilis* QB943 was grown in BHI. YE supplemented with $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ thymine and $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ uracil till a cell concentration of $\pm 1 \times 10^8$ cell ml^{-1} was reached and infected at a moi 10^{-1} . Just before infection $10 \mu\text{Ci ml}^{-1}$ of [³H] uridine were added to the culture. The mixture was shaken 8 hours at 37°C and incubated overnight without shaking. The cultures were centrifuged 10 minutes at $7000 \times g$, concentrated ($60\,000 \times g$, for 90 minutes) and purified by discontinuous CsCl gradient for four hours at $40\,000 \times g$.

[¹⁴C] labelled ϕ 105 was used as a density marker and was obtained through mitomycin C induction of IGCg 240. Upon induction, $0.5 \mu\text{Ci ml}^{-1}$ of [¹⁴C] thymidine were added to the culture growing medium. ϕ 105 has been concentrated and purified as described above.

In order to determine the buoyant density of the phage particles 3 ml of a phage suspension in a CsCl solution with final mean density of 1.44 gr cm^{-3} was centrifuged at 38 000 rpm and 12°C in a International SB 405 rotor for 24 hours. Groups of two drops ($15 \mu\text{l}$ each) were collected and their radioactivity and refractive index were measured.

Agarose gel electrophoresis

Extraction of phage DNAs had been performed according to MANIATIS *et al.* (1982). Phage DNAs were mixed with the endonucleases (usually one unit per μg of DNA) in the appropriate buffer and incubated for 3 hours at 37°C. Agarose gels contained 0.8% agarose in tris-borate buffer. Electrophoresis was usually performed at 25 mA for 16 to 18 hours. To visualize the DNAs the gels were stained with ethidium bromide ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) and illuminated with long wavelength UV light. Photographs were taken with Polaroid film 665.

RESULTS

The initial heat sensitivity and the kinetics of inactivation by ultraviolet light were very similar for the four phages (Fig. 1, 2).

The transducing particles showed higher resistance to ultraviolet irradiation than plaque forming units (approximately one log difference between them) as pre-

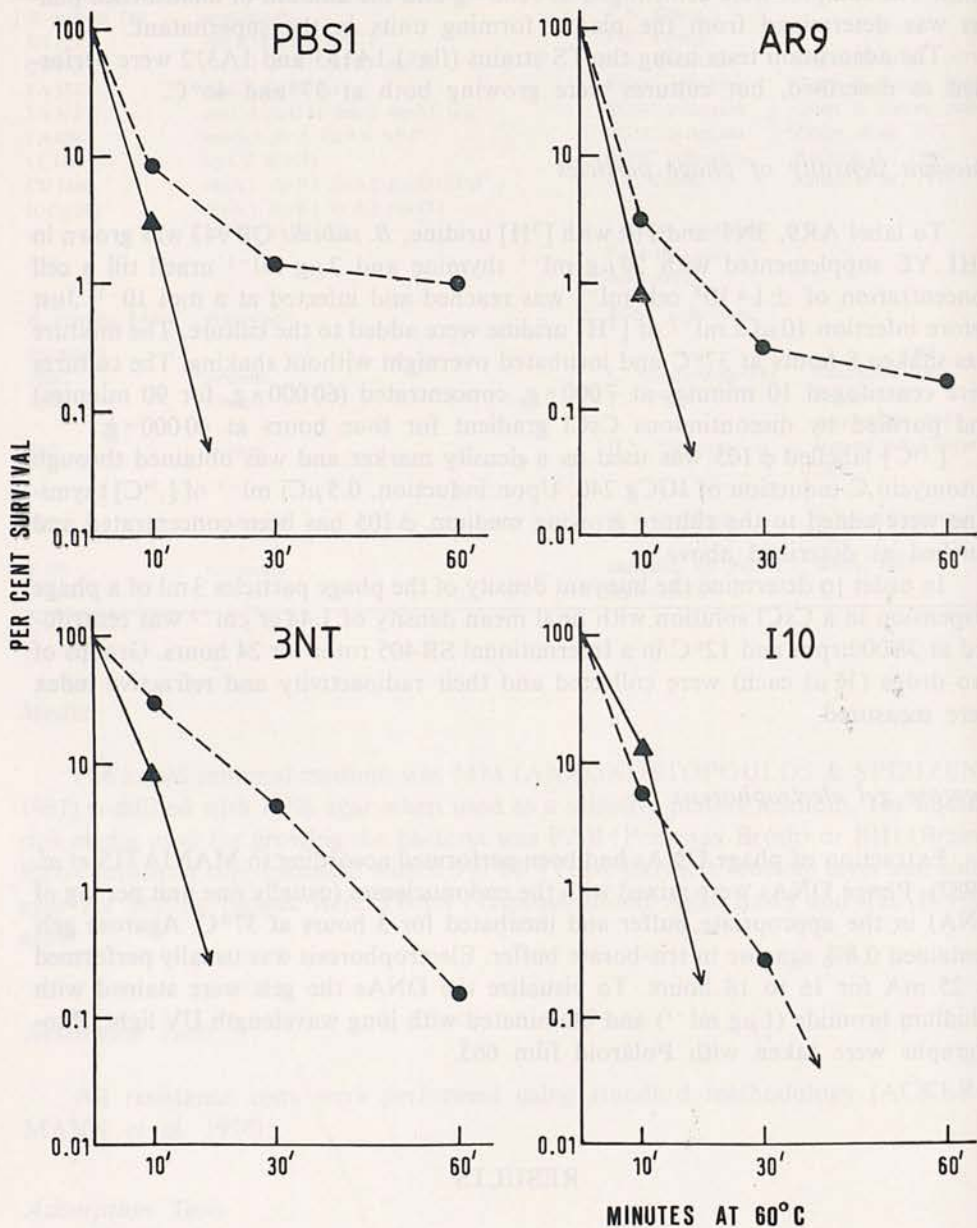


Fig. 1 — HEAT SENSITIVITY — The phages were incubated in a shaking waterbath. Samples removed at intervals were cooled in ice and used to transduce BR151 ant to determine the number of p.f.u.

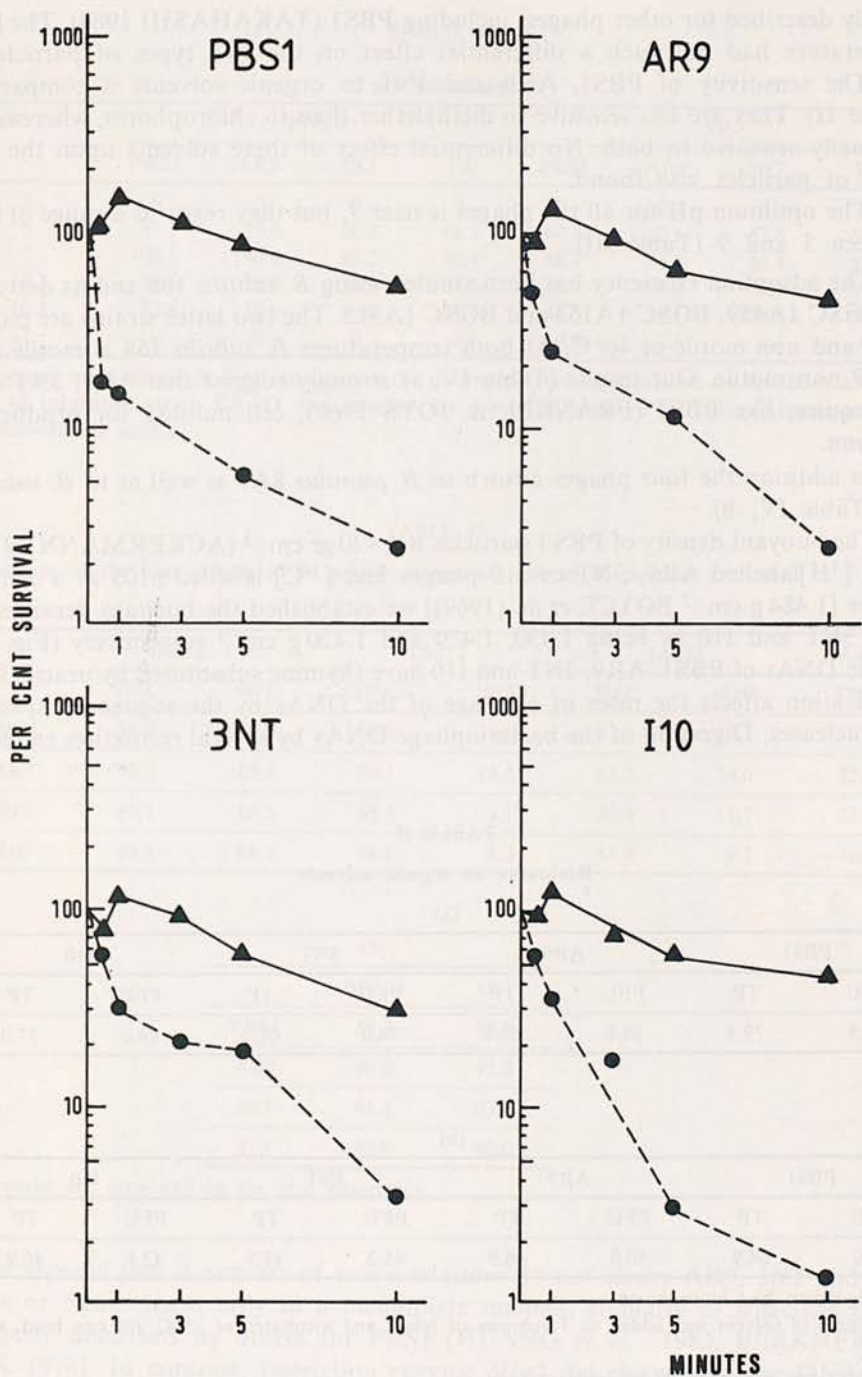


Fig. 2 — ULTRAVIOLET SENSITIVITY — The UV source used was a 15 W General Electric germicidal lamp having an energy emission of 30 erg/s/mm². The phages have been diluted in MM.

viously described for other phages, including PBS1 (TAKAHASHI 1963). The high temperature had not such a differential effect on the two types of particles.

The sensitivity of PBS1, AR9 and 3NT to organic solvents is comparable (Table II). They are less sensitive to diethylether than to chlorophorm, whereas I10 is equally sensitive to both. No differential effect of these solvents upon the two types of particles was found.

The optimum pH for all the phages is near 7, but they resist to a range of pHs between 5 and 9 (Table III).

The adsoption efficiency has been studied using *B. subtilis* 168 and its derivatives BGSC 1A459, BGSC 1A153 and BGSC 1A312. The two latter strains are motile at 37 and non motile at 46°C. At both temperatures *B. subtilis* 168 is motile and 1A459 non motile. Our results (Table IV, a) strongly suggest that AR9, 3NT and I10 require, like PBS1 (FRANKEL & JOYS 1966), cell motility for productive infection.

In addition the four phages adsorb to *B. pumilus* 8A1 as well as to *B. subtilis* 168 (Table IV, b).

The buoyant density of PBS1 particles is 1.420 gr cm⁻³ (ACKERMANN 1974). Using [³H]labelled AR9, 3NT or I10 phages and [¹⁴C] labelled ϕ 105 as a density marker [1.484 g cm⁻³ BOYCE *et al.* (1969)] we established the buoyant densities of AR9, 3NT and I10 as being 1.430, 1.429 and 1.420 g cm⁻³ respectively (Fig. 3).

The DNAs of PBS1, AR9, 3NT and I10 have thymine substituted by uracil. This modification affects the rates of cleavage of the DNAs by the sequence-specific endonucleases. Digestion of the bacteriophage DNAs by several restriction endonu-

TABLE II
Resistance to organic solvents

(a)

PBS1		AR9		3NT		I10	
PFU	TP	PFU	TP	PFU	TP	PFU	TP
86.5	79.4	84.0	68.8	74.0	61.2	44.0	57.0

(b)

PBS1		AR9		3NT		I10	
PFU	TP	PFU	TP	PFU	TP	PFU	TP
51.0	64.9	50.0	46.9	45.2	44.5	42.4	46.9

a) Diethylether; b) Chlorophorm

One volume of solvent was added to 3 volumes of lysate and incubated at 25°C, for one hour, with shaking.

The results are presented in per cent survival.

PFU = plaque-forming units.

TP = transducing activity.

TABLE III

pH Sensitivity

	PFU				TP			
	PBS1	AR9	3NT	I10	PBS1	AR9	3NT	I10
3	0	0	0	0	0	0.3	0	0.5
5	67.7	70.0	66.7	68.2	60.4	80.1	52.6	54.8
7	100.0	100.0	87.5	90.9	88.1	96.3	86.8	85.7
9.2	80.6	78.0	58.3	54.6	62.7	81.3	76.3	57.1
10.5	57.8	59.0	36.0	21.0	46.5	36.1	39.5	54.8
12	0	0	0	0	0.9	2.5	0.1	0.5

The phages were diluted in PAB adjusted to the desired pH values, incubated for one hour at 25°C, used to transduce strain BR 151 and assayed for surviving phage. PFU=plaque-forming units. TP=transducing activity.

TABLE IV

Adsorption of the four phages to *B. subtilis* strains (a) and to *B. pumilus* 8A1 (b).

(a)

	BS168 T ⁺		1A312		1A153		1A459
	37°C	46°C	37°C	46°C	37°C	46°C	37°C
PBS1	90.7	65.9	76.6	9.5	53.5	13.5	7.5
AR9	93.2	65.9	70.1	15.5	51.3	24.0	22.0
3NT	89.1	68.2	65.3	9.1	55.9	11.7	17.6
I10	94.3	68.7	74.6	8.3	51.4	9.7	10.8

(b)

	BR151	8A1
PBS1	88.3	85.5
AR9	96.8	93.3
3NT	95.1	93.0
I10	92.9	90.0

The results are presented in per cent adsorption.

cleases showed that a number of enzymes either do not cleave AR9, 3NT and I10 DNAs or cleave them only in a incomplete manner, similarly to what has been previously described by others for PBS1 (HUANG *et al.* 1982; BERKNER & FOLK 1978). In contrast, restriction enzyme *HhaI* did cleave the four DNAs in discrete fragments and, furthermore, originated a different electrophoretical profile for each of the four phages (Fig. 4).

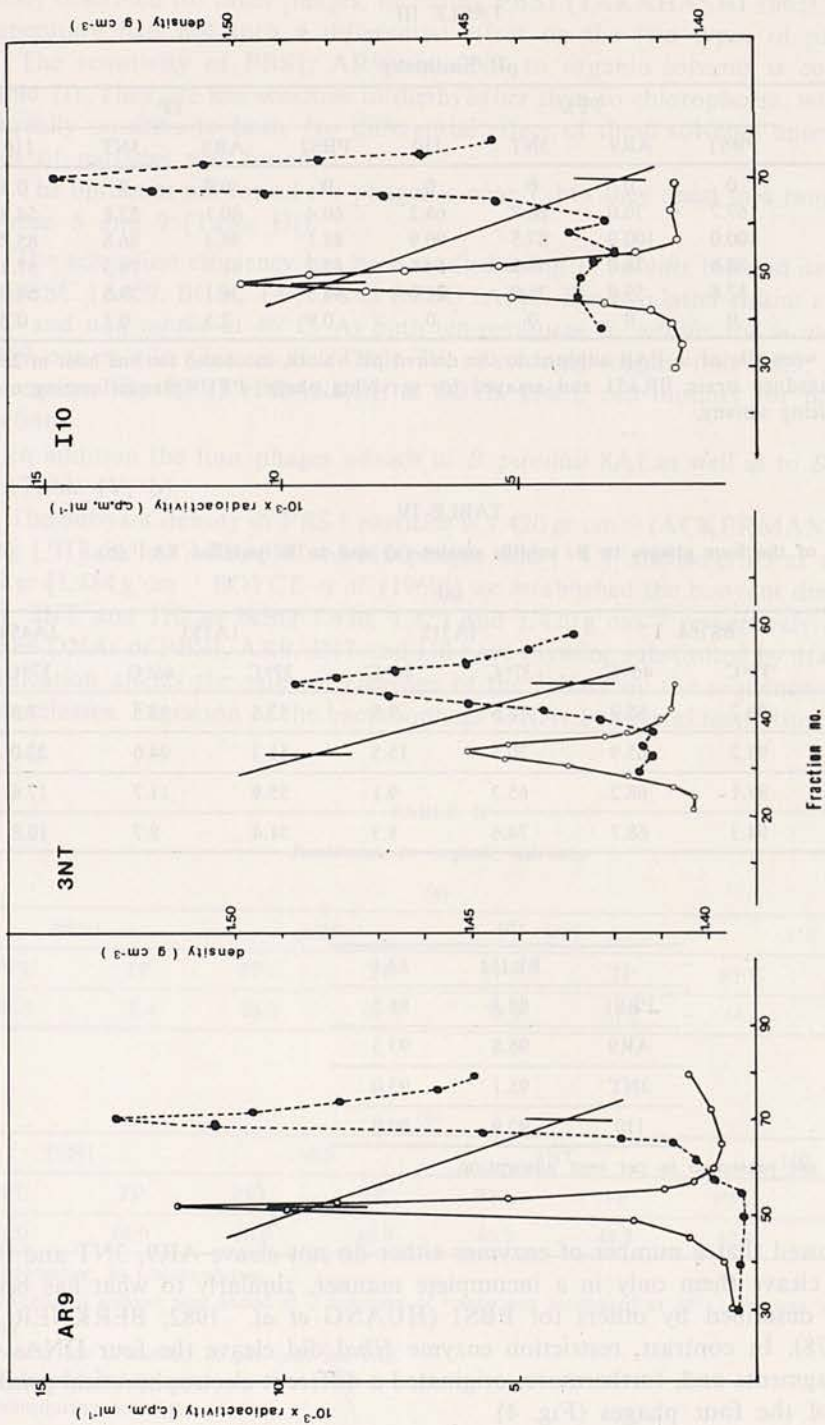


Fig. 3 — BUOYANT DENSITIES of phages AR9, 3NT and I10 in CsCl gradients.

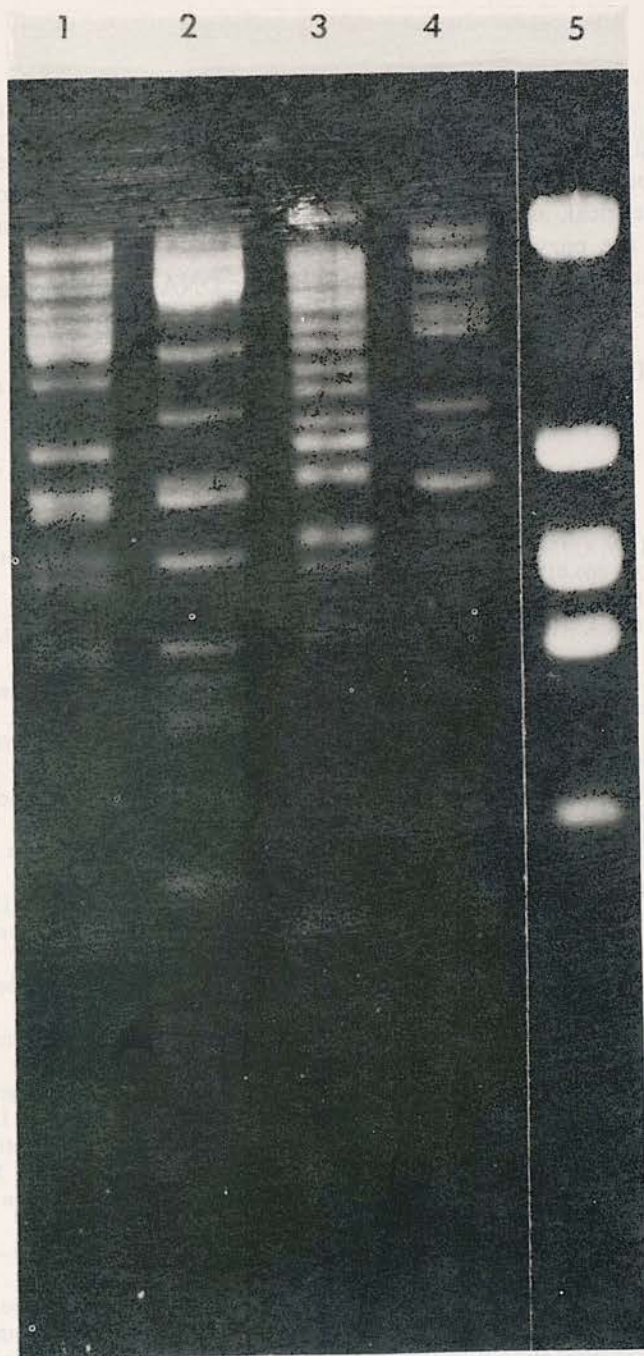


Fig. 4 — ELECTROPHORESIS of the DNAs restricted with *HhaI*.

HhaI digests of DNA from phage PBS1 (lane 1), 3NT (lane 2), I10 (lane 3) and AR9 (lane 4); *EcoRI* digest of λ DNA (lane 5).

CONCLUSIONS

Despite all similarities shown by these four phages (host range, adsorption requirements, buoyant densities, resistance to several physical and chemical agents), they are not identical, as shown by different restriction patterns obtained by DNA digestion with the enzyme *Hha*I.

Further analysis of the differences between the DNAs of the phages is currently being explored.

We thank Dr. H.Y. Steensma for sending us bacteriophages 3NT and I10 used in this work.

REFERENCES

- ACKERMANN, H.-W. (1974) — La classification des bacteriophages de «*Bacillus*» et «*Clostridium*». *Pathol. Biol.* 22: 909-917.
- ACKERMANN, H.-W., AUDURIER, A., BERTHIAUME, L., JONES, L.A., MAYO, J.A. and VIDAVER, A.K. (1978) — Guidelines for bacteriophage characterization. *Adv. in Virus Res.* 23: 1-24.
- ANAGNOSTOPOULOS, C. and SPIZIZEN, J. (1961) — Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 81: 741-746.
- BELYAEVA, N.N. and AZIZBEKYAN, R.R. (1967) — A new phage of *Bacillus subtilis* with unusual morphology. *Mikrobiologiya* 36: 1054-1059.
- BERKNER, K.L. and FOLK, W.R. (1978) — The effects of substituted pyrimidines in DNAs on cleavage by sequence-specific endonucleases. *J. Biol. Chem.* 254: 2551-2560.
- BOYCE, L., EISERLING, F.A. and ROMIG, W.R. (1969) — Similarity of *Bacillus subtilis* phages SPO2, ϕ 105 and SPP1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 34: 398-403.
- DEDONDER, R.A., LEPESANT, J.A., KEJLAROVA, J.L., BILLAUT, A., STEINMETZ, M. and KUNST, F. (1977) — Construction of a kit of reference strains for rapid genetic mapping in *Bacillus subtilis* 168. — *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 989-993.
- FRANKEL, R.W. and JOYS, T.M. (1966) — Adsorption specificity of bacteriophage PBS 1. *J. Bacteriol.* 92: 388-389.
- GRANT, G.F. and SIMON, M. (1968) — Synthesis of bacterial flagella. II PBS 1 transduction of flagella — specific markers in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 95: 81-86.
- HUANG, L.-H., FARNET, C.M., EHRLICH, K.C. and EHRLICH, M. (1982) — Digestion of highly modified bacteriophage DNA by restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res.* 10: 1579-1591.
- IVANOVICS, G. and CSISZAR, K. (1982) — Isolation and some characteristics of subtilis phages with transducing activity. *Acta Microbiologia Academiae Scientiarum Hungaricae* 9: 209-218.
- KAWAMURA, F., SAITO, H. and IKEDA, Y. (1979) — A method for construction of specialized transducing phage ρ 11 of *Bacillus subtilis*. — *Gene* 5: 87-91.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. and SAMBROOK, J. (1982) — *Molecular cloning — A laboratory manual*, Cold Spring Harbor, New York.
- REILLY, B.E. (1965) — Ph.D. Thesis, Western Reserve University, Cleveland, Ohio.
- RIMA, B.K. and STEENSMA, H.Y. (1971) — Bacteriophages of *Bacillus subtilis*: comparison of different isolation techniques and possible use for classification of *Bacillus subtilis* strains. *Antonie van Leeuwenhoek* 37: 425-434.
- RUTBERG, L. (1969) — Mapping of a temperate bacteriophage active on *Bacillus subtilis* — *J. Virol.* 3: 38-44.
- TAKAHASHI, I. (1961) — Genetic transduction in *Bacillus subtilis*. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 5: 171-175.

- TAKAHASHI, I. (1963) — Transducing phages for *Bacillus subtilis*. — *J. Gen. Microbiol.* 31: 211-217.
- ZAHLER, S.A., KORMAN, R.Z., ROSENTHAL, R. and HEMPHILL, H.E. (1977) — *Bacillus subtilis* bacteriophage SP β : Localization of the prophage attachment site, and specialized transduction. *J. Bacteriol.* 129: 556-558.

5th CONGRESS
OF THE
EUROPEAN ANTHROPOLOGICAL ASSOCIATION

1985, 28-31 August, 1985

Manuscript received 12 hours before the closing date of the 5th European Anthropological Association Congress, and accepted for publication after the closing date of the 5th European Anthropological Association Congress.

Q-Form of the Congress will be published in the *Journal of Anthropological Society of London*. A list of participants and a list of the names of the members of the Congress will be published in the *Journal of Anthropological Society of London*.

Information about the Congress can be obtained from the following sources:

1. Centre de Recherches

Anthropologiques, Université de Liège, Belgium

2. Department of Anthropology, University of London

3. Department of Anthropology, University of Cambridge

5th CONGRESS
OF THE
EUROPEAN ANTHROPOLOGICAL ASSOCIATION

Lisboa, 28/9—4/10, 1986

Vamos ter o gosto e a honra de ver realizar-se entre nós este importante Congresso, que atrairá ao nosso país um elevado número de especialistas estrangeiros.

O tema do Congresso será: «Uma perspectiva antropológica do ciclo da vida humana». A sua organização é dirigida pela Doutora Maria Emília de Castro e Almeida, Vice-presidente e delegada de Portugal da European Anthropological Association.

Informações sobre o Congresso e seu programa podem obter-se no

Centro de Antropobiologia
Instituto de Investigação Científica Tropical
Av. Óscar Monteiro Torres, 34—1.º E
1000 LISBOA Tel. 76 66 70