

**BC/28256**

**IB/80066**



**UNICAMP**

T/UNICAMP

T13<sub>i</sub>



**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA SEQUÊNCIA DE**

**DNA ENVOLVIDA COM PATOGENICIDADE DE *Xanthomonas***

***campestris* pv vesicatoria EM TOMATE**

**SANDRA TOSHICO TAHARA**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato a) Sandra Toshico Tahara e aprovada pela Comissão Julgadora.

10/06/96 YBM

Dissertação apresentada ao Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas - Área de concentração Genética

**ORIENTADORA: PROF<sup>A</sup>. DR<sup>A</sup>. YOKO BOMURA ROSATO**

**CAMPINAS**

**1996**

UNIDADE	IB
N.º CHAMADA	T/Unicamp
	IB
V.º	EX
	28.256
	667/96
S	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	14.08.96
N.º CPD	


CM-00091437-1

LOCAL E DATA: Campinas, 10 de junho de 1996.


BANCA EXAMINADORA:

Titulares:

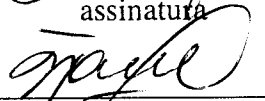
Profa. Dra. Yoko Bomura Rosato

  
\_\_\_\_\_  
assinatura

Profa. Dra. Anete P. de Souza

  
\_\_\_\_\_  
assinatura

Prof. Dr. Tomomasa Yano

  
\_\_\_\_\_  
assinatura

Suplente:

Dr. Celso E. Benedetti

  
\_\_\_\_\_  
assinatura

APROVADA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

T13i

Tahara, Sandra Toshico

Isolamento e caracterização de uma nova sequência de DNA envolvida com patogenicidade de *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria em tomate / Sandra Toshico Tahara. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Yoko Bomura Rosato.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. *Xanthomonas campestris*. 2. Tomate.  
3. Fitopatologia. 4. Bacterioses. I. Rosato, Yoko Bomura.  
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

## AGRADECIMENTOS

À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Yoko Bomura Rosato, pela orientação, paciência e acolhida em seu laboratório, onde pude contar com um ótimo ambiente de trabalho;

À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Anete P. de Souza, pela leitura deste manuscrito e valiosas sugestões na correção do trabalho;

Ao prof. Dr. Tomomasa Yano, pela participação na banca do exame de qualificação, leitura deste manuscrito e pelos valiosos comentários da tese;

Ao Dr. Celso E. Benedetti pela leitura deste manuscrito e pelas importantes discussões e correções da tese;

Às prof<sup>as</sup> Dr<sup>as</sup> Solange Bento Farah e Laura M. M. Ottoboni, pela participação na banca do exame de qualificação;

Ao amigo Julio R. Neto do Instituto Biológico, pelo fornecimento das linhagens bacterianas deste trabalho;

Aos técnicos Sandra e Wilson, pela ajuda prestada para o andamento deste trabalho;

Às secretárias do CBMEG, Sandra, Tânia e Claudinha, pela atenção e disponibilidade; e à secretária da pós-graduação, Tereza, pela eficiência e bom humor;

Aos vizinhos de laboratório, Marília, Tereza, Rogério, Emília, Claudete e Mano, pela agradável convivência;

Aos colegas do CBMEG, em especial ao Andrés, Dante, Germano, André, Edson, Silvia, Felipe, Ana Cláudia, Juliana, Nair, Maria Elena, Berenice, Luciana Lanza, e Luzinha que me receberam super bem deixando o ambiente de trabalho super gostoso;

À Lucília, por melhorar o ranzinza do Sibov e tornar nossas manhãs mais agradáveis;

À Rosângela, pelo super auxílio na elaboração das fotos;

Aos amigos Beriam, Antonia e Fá por deixarem o lab. tão divertido;

Ao Zé (Henrique), pelo “auxílio” na redação do abstract e caronas matinais, e pela agradável convivência no lab., apesar das arestas;

Ao Zezinho (N. M.), pelos ensinamentos de Mestre “Malabin”, inúmeros palpites, sugestões, risadas, enfim, pela grande amizade;

À “Mamá”, pela grande amizade e apoio em todos estes anos;

Ao Leelão, pelo apoio técnico e moral que só os grandes amigos sabem dar e a Eneida, por fazer o Leelão feliz e por cuidar dos meus cabelos;

Às amigas Mara, Ivy e Ju, pela simpatia que conquista todo mundo;

Ao CNPq, FAEP e meus pais pelo apoio financeiro, e

Aos meus pais e irmãos que sempre me apoiaram e me ajudaram a realizar meus sonhos.

## ÍNDICE

RESUMO.....	<i>i</i>
ABSTRACT.....	<i>iv</i>
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Fitopatogenicidade.....	5
2.2. Classificação de genes de patogenicidade.....	7
2.3. Genes envolvidos na patogenicidade.....	8
2.4. Genes de patogenicidade em <i>X. campestris</i> .....	11
2.5 <i>X. campestris</i> pv. vesicatoria.....	13
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. Linhagens e plasmídios.....	19
3.2. Plantas utilizadas.....	22
3.3. Meios de cultura e soluções.....	22
3.3.1. NYGB e NYGA.....	22
3.3.2. LB.....	22
3.3.3. MS.....	23
3.3.4. MPI.....	24
3.3.5. Meio de detecção de enzimas extracelulares.....	24
-Meio para detecção de atividade proteolítica.....	24
-Meio para detecção de atividade amilolítica.....	24
-Meio para detecção de atividade celulolítica.....	24
-Meio M9.....	25
-Sais M9.....	25
-Meio para detecção de atividade pectolítica.....	25
3.3.6. Antibióticos.....	26
3.4. Teste de patogenicidade.....	26



3.4.1. Teste em sementes.....	26
3.4.2. Teste em folhas de plantas adultas.....	27
3.4.3. Teste em plântulas.....	27
3.4.4. Teste em hipocótilos.....	27
3.4.5. Teste de hipersensibilidade em tabaco.....	28
<b>3.5. Eletroporação.....</b>	<b>28</b>
<b>3.6. Análise de proteínas totais.....</b>	<b>29</b>
3.6.1. Extração de proteínas totais.....	29
3.6.2. Gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE).....	29
3.6.3. Coloração das proteínas por impregnação por prata.....	30
<b>3.7. Produção de exopolissacarídeos.....</b>	<b>31</b>
<b>3.8. Manipulação do DNA.....</b>	<b>31</b>
3.8.1. Extração de DNA.....	31
3.8.2. Ligação e transformação.....	32
3.8.3. Hibridização.....	32
<b>3.9. Subclonagem do fragmento EE41.....</b>	<b>33</b>
<b>3.10. Sequenciamento de DNA.....</b>	<b>34</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1. Caracterização preliminar dos clones VE41, VE42, VE43 e VE44.....</b>	<b>36</b>
4.1.1. Determinação do tamanho dos insertos contidos nos pVEs.....	36
4.1.2. Testes de patogenicidade dos mutantes complementado 7/pVE41, 7/pVE42, 7/pVE43 e 7/pVE44.....	36
4.1.3. Hibridização.....	38
4.1.4. Perfil de Proteínas Totais.....	44
4.1.5. Produção de enzimas extracelulares.....	46
<b>4.2. Caracterização do clone VE41.....</b>	<b>49</b>
4.2.1. Testes de patogenicidade e crescimento “in planta”.....	49
4.2.2. Teste de hipersensibilidade.....	55
4.2.3. Transferência do pVE41 para outras linhagens receptoras.....	55

4.2.4. Hibridização de DNA total de outras linhagens e patovares com a sonda EE41.....	63
4.2.5. Produção de EPS.....	64
4.2.6. Mapa de restrição.....	67
<b>4.3. Obtenção e Caracterização dos subclones de EE41.....</b>	<b>68</b>
4.3.1. Subclonagem do EE41.....	68
4.3.2. Transferência dos insertos de pKSH05, pKSH15 e pKSH20 para vetor pUFR027.....	68
4.3.3. Testes de patogenicidade dos subclones VE05, VE15 e VE20.....	71
4.3.4. Produção de enzimas extracelulares.....	74
4.3.5. Produção de goma xantana (EPS) pelos subclones.....	75
<b>4.4. Sequenciamento.....</b>	<b>75</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>81</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>89</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>90</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Eletroforese dos plasmídios pVEs.....	37
FIGURA 2: Porcentagem de plântulas afetadas no teste de patogenicidade em sementes de tomate.....	40
FIGURA 3: Porcentagem de hipocótilos afetados.....	41
FIGURA 4: Porcentagem de plântulas afetadas no teste em plântulas.....	42
FIGURA 5: Eletroforese de DNA genômico e plasmidial.....	43
FIGURA 6: Eletroforese de proteínas totais.....	45
FIGURA 7: Densitometria.....	47
FIGURA 8: Teste de patogenicidade em folhas pimentão .....	50
FIGURA 9: Curva de crescimento bacteriano em plântula de 7/pVE41.....	52
FIGURA 10: Curva de crescimento bacteriano em hipocótilo de 7/pVE41.....	53
FIGURA 11: Curva de crescimento bacteriano em folhas de 7/pVE41.....	54
FIGURA 12: Teste de patogenicidade em folha de tabaco.....	56
FIGURA 13: Curva de crescimento bacteriano do teste em sementes de 7/pVE41.....	59
FIGURA 14: Curva de crescimento bacteriano do teste em sementes com os diferentes patovares.....	60
FIGURA 15: Eletroforese de DNAs genômicos de <i>X. c.</i> de vários patovares.....	65
FIGURA 16: Representação esquemática da subclonagem do pVE41.....	69
FIGURA 17: Eletroforese dos subclones.....	70
FIGURA 18: Curva de crescimento bacteriano do teste em semente com os subclones no mutante 7/24 e no linhagem <i>X. c. m.</i> 289.....	73
FIGURA 19: Representação esquemática do mapa de restrição do KS41.....	76
FIGURA 20: Sequência do inserto EE41.....	78

## ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: Linhagens de bactérias utilizadas.....	19
TABELA 2: Plasmídios utilizados.....	21
TABELA 3: Tratamento do gel de poliacrilamida para coloração com prata.....	30
TABELA 4: Número de plântulas afetadas no teste de patogenicidade em sementes hipocótilos e plântulas de 7/pVE41.....	39
TABELA 5: Produção de enzimas extracelulares .....	48
TABELA 6: Porcentagem de plântulas afetadas no teste em sementes com as linhagens de <i>X. c.</i> de vários patovares.....	57
TABELA 7: Teste em folhas com <i>X. c.</i> de diferentes patovares.....	62
TABELA 8: Produção de EPS.....	66
TABELA 9: Digestão do EE41 com enzimas de restrição.....	67
TABELA 10: Porcentagem de plântulas afetadas no teste em sementes dos subclones de VE41.....	72

## LISTA DE ABREVIÇÕES

kb: quilobases

kDa: quilodaltons

q.s.p.: quantidade suficiente para

EDTA: ácido etilenodiamino-tetracético

v/v: relação volume/volume

V: volts

KV: quilovolts

SDS: dodecilsulfato de sódio

rpm: rotações por minuto

Tris: tris-(hidroximetil)-aminometano

PEG: polietileno glicol

## RESUMO

*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* é uma bactéria gram-negativa fitopatogênica causadora da mancha bacteriana em tomate e pimentão. A mancha bacteriana causa grandes perdas nas culturas de tomate e pimentão, e portanto, estudos a respeito do mecanismo de patogenicidade são necessários para um melhor conhecimento e controle dessa doença.

Foi isolado um mutante não patogênico (designado mutante 7) da linhagem *X. campestris* pv. *vesicatoria* 479 após mutagênese com nitrossoguanidina. O mutante foi complementado com o banco genômico da linhagem *X. campestris* pv. *vesicatoria* 317. Os clones genômicos VE41, VE42, VE43 e VE44 foram selecionados por restabelecerem a patogenicidade do mutante 7 em testes de patogenicidade (Marques, 1992). Os mutantes complementados com os clones, designados 7/pVE41, 7/pVE42, 7/pVE43 e 7/pVE44, foram submetidos a novos e extensivos testes de patogenicidades em semente, hipocótilos, plântula e folhas de tomate e pimentão.

Os resultados indicaram que o clone VE41 foi aquele que melhor complementou o mutante 7 em todos os testes de patogenicidade, sendo portanto, selecionado para uma melhor caracterização. A possibilidade do clone VE41 conter genes *avr* ou *hrp* foi desprezada, pois os mutantes complementados continuaram patogênicos para seus hospedeiros e causaram reação de hipersensibilidade verificado em tabaco. A transferência do plasmídio pVE41 para linhagens receptoras de *X. campestris* pv. *manihotis* 289, *glycines* 333 e *phaseoli* 558 demonstrou que os novos transformantes não

reconheceram o tomate e pimentão como plantas hospedeiras, o que sugere que pVE41 não contém genes do tipo *hsv*. Quando os transformantes foram testados em suas respectivas plantas hospedeiras, não houve intensificação da resposta de patogenicidade, indicando a não superexpressão de genes. O fragmento de DNA isolado do plasmídeo pVE41, denominado EE41, possivelmente está envolvido na indução específica de doença (*dsp*).

A hibridização de DNA total das linhagens de *X. campestris* de diferentes patovares com o inserto EE41, demonstrou existência de sequências homólogas nessas linhagens e que *X. campestris* pv. vesicatoria poder ser distinguida em dois subgrupos pelo polimorfismo de bandas de hibridização, correlacionadas com o tipo de hospedeiro.

Através do perfil de proteínas totais verificou-se que a proteína de 32 kDa, que tem sido utilizada para caracterizar o patovar vesicatoria, poderia ser responsável pela alteração na patogenicidade do mutante 7 e que a existência de diferentes bandas presentes nos clones VE41, VE42, VE43 e VE44 poderiam atuar na restauração da patogenicidade.

Na tentativa de se localizar o determinante responsável pela patogenicidade no inserto EE41, foram construídos os subclones KSH05, KSH15 e KSH2. Testes em sementes e folhas de tomate, foram realizados com esses subclones, entretanto nenhum desses desenvolveram sintoma de doença, possivelmente devido a interrupção de alguma região importante para a patogenicidade.

O fragmento EE41 possui 4255 pares de bases e três possíveis ORFs nos frames 1 e 3 que não apresentaram homologia com nenhuma sequência depositada no Genbank e Swiss Prot. No frame -1 foi detectada uma identidade de 52%, num total de 44 aminoácidos com a subunidade  $\beta$  da DNA girase e topoisomerase.



## ABSTRACT

The gram-negative bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is the causal agent of the bacterial spot disease affecting tomato and pepper. Therefore, studies regarding the pathogenicity mechanism is useful in order to improve the understanding and to develop more efficient ways to control the disease.

A non-pathogenic mutant (mutant 7) of *X. campestris* pv. *vesicatoria* 479 strain was isolated after NTG mutagenesis experiments. In complementation experiments, using a genomic library from the wild type *X. campestris* pv. *vesicatoria* 317, four clones (VE41, VE42, VE43 e VE44) were identified which were capable to restore the pathogenicity phenotype upon introduction in the mutant 7 (Marques, 1992). After that, these clones were carefully examined by pathogenicity tests in seeds, hypocotyls, seedlings and adult leaves of tomato and pepper plants.

The clone VE41 should be involved neither to *avr* or *hrp* genes because the complemented mutant remained pathogenic in their hosts and were able to develop HR reaction in tobacco.

Transferring the pVE41 into *X. campestris* pv. *manihotis* 289, *citri* 223, *glycines* 333 and *phaseoli* 558 recipients it was observed that the new transformants were not able to recognize tomato and pepper plants as their hosts, allowing us to exclude the involvement to *hsv* genes. When these bacteria were tested in their respective hosts, there was not observed any increase in the pathogenic response, showing non-overexpression

of the isolated gene. The isolated fragment, EE41, might be related to the disease specific gene (*dsp*).

Hybridization of total DNA from the different *X. campestris* pathovars, using the EE41 fragment as probe, showed homologous sequences in these strains. Two different subgroups were distinguished into *X. campestris* pv. *vesicatoria* by band polymorphisms observed in the hybridization experiments, this subdivision was in accordance with the different host specificity of the strains analysed.

Analysis of the whole cell proteins in SDS-PAGE experiments showed that the 32 kDa band, which has been used to characterize the *vesicatoria* pathovar, might be responsible for the detected pathogenicity alteration presented by the mutant 7 and the existence of different bands in the VE41, VE42, VE43 and VE44 clones could have a role in the pathogenicity restoration.

Three subclones, KSH05, KSH15 and KSH20, were constructed in order to localize the pathogenicity determinant into the EE41 fragment. New pathogenicity tests in seeds and adult leaves of tomato, were carried out using mutant 7 transconjugants carrying these subclones, but, none could restore disease symptoms. This result suggests that some important sequence for pathogenicity was disrupted by the restriction enzyme.

DNA sequence analysis revealed that the EE41 fragment is 4255 bp long and contain three ORFs the both in the frame 1 and 3, but no homology with any known sequences from Genbank banks. In the -1 frame a deduced amino acid region of 44

aminoacids showing 52% identify, with the  $\beta$  subunit of the DNA girase and topoisomerase enzymes was detected.

## 1. INTRODUÇÃO

*Xanthomonas campestris* (*X. campestris*) é uma das espécies de bactérias fitopatogênicas mais estudadas uma vez que é responsável por lesões necróticas em folhas, caules e frutos, murchas, maceração de tecido e hiperplasia em diversas espécies de plantas (Leyns *et al.*, 1984).

*X. campestris* patovar vesicatoria (*X. campestris* pv. vesicatoria) é o agente responsável pela mancha bacteriana de tomate (*Lycopersicon esculentum*) e pimentão (*Capsicum annuum*). Esta doença pode causar perdas significativas na produção agrícola (30-35%), particularmente em ambientes quentes e úmidos como é o caso do Brasil, quando não são adotadas medidas de controle (Romeiro, 1985). As medidas de controle disponíveis não tem se mostrado muito eficazes, desde que consistem em aplicação de antibióticos ou agentes cúpricos, levando à seleção de linhagens bacterianas resistentes (Minsavage *et al.*, 1990a; Stall *et al.*, 1986).

Dado o grande valor econômico da cultura do tomate, sendo uma das hortaliças de maior consumo e industrialização no Brasil e no mundo, se faz necessário um método eficaz de controle, bem como, o desenvolvimento de pesquisas que visam a elucidação do processo de interação planta-patógeno.

Nos últimos anos, estudos moleculares dos mecanismos de patogenicidade bacteriana tem sido intensificados e foram identificados vários tipos de genes envolvidos na interação planta-bactéria.

As técnicas moleculares tem-se mostrado como um poderoso instrumento para investigar a natureza de determinantes da patogenicidade destas bactérias. No entanto, até o momento, são poucos os determinantes conhecidos.

Genes requeridos para patogenicidade em plantas hospedeiras foram identificados em uma variedade de bactérias fitopatogênicas, por exemplo: *X. campestris* pv. *campestris* (Daniels *et al.*, 1984; Shaw *et al.*, 1988), *Erwinia amylovora* (Steinberger & Beer, 1984), *Pseudomonas solanacearum* (Boucher *et al.*, 1987) e *Pseudomonas syringae* (Lindgreen *et al.*, 1986). Estes genes de compatibilidade básica tem sido classificados em três grupos principais: genes *dsp*, específicos de doença (Boucher *et al.*, 1987), genes *hrp*, de patogenicidade e resposta de hipersensibilidade (Lindgreen *et al.*, 1986) e os genes *hsv*, de especificidade de hospedeiros (Mellano & Cooksey, 1988; Waney *et al.*, 1991). Existem ainda os genes *avr*, de avirulência (Staskawicz *et al.*, 1984), que envolvem o controle de especificidade raça-cultivar.

Em *X. campestris* pv. *vesicatoria*, foram identificados até o momento vários genes *avr* (Swason *et al.*, 1988; Ronald & Staskawicz, 1988; Minsavage *et al.*; 1990b; Kearney & Staskawicz, 1990), *hrp* (Bonas *et al.*, 1991; Schulte & Bonas, 1992), um único locus *dsp* (Seal *et al.*, 1990) e um locus *hsv* (Gonçalves, 1996).

Devido ao limitado conhecimento dos genes *hsv* e *dsp* em *X. campestris*, o objetivo deste trabalho foi à caracterização de alguns clones envolvidos com a patogenicidade de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Marques, 1992). A linhagem de *X. campestris* pv. *vesicatoria* 479 foi mutagenizada com nitrosoguanidina (NTG), obtendo-se 300 colônias que foram testadas em plântulas e folhas de tomate. Através destes testes

de patogenicidade, selecionou-se o mutante 7 que perdeu a capacidade de desenvolver sintomas de doença em suas plantas hospedeiras. A complementação desse mutante foi efetuada com um banco genômico da linhagem selvagem *X. campestris* pv. vesicatoria 317, selecionando-se os clones VE41, VE42, VE43, VE44. Estes clones complementando o mutante 7, foram chamados de mutantes complementados 7/pVE41, 7/pVE42, 7/pVE43 e 7/pVE44, respectivamente (Marques, 1992).

No presente trabalho, foram efetuados testes de patogenicidade com os mutantes complementados 7/pVE41, 7/pVE42, 7/pVE43 e 7/pVE44, sendo selecionado o 7/pVE41 para uma melhor caracterização por apresentar níveis de patogenicidade mais próximos ao da linhagem selvagem. O mutante complementado 7/pVE41 foi caracterizado quanto à patogenicidade em semente de tomate, em folhas de tomate e pimentão, produção de enzimas extracelulares e exopolissacarídeo e perfil de proteínas totais. O fragmento EE41, contido no plasmídio pVE41, foi sequenciado e o resultado foi analisado em bancos de dados.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A Família Pseudomonadaceae inclui os principais gêneros de bactérias fitopatogênicas estudadas: *Pseudomonas* e *Xanthomonas*.

*Xanthomonas* é um grupo de bactérias gram-negativas, aeróbicas quase que exclusivamente fitopatogênicas.

Segundo Van den Mooter *et al* (1987), o gênero *Xanthomonas* era dividido em oito espécies: *X. albilineans*, *X. axonopodis*, *X. campestris*, *X. fragariae*, *X. graminis*, *S. maltophilia*, *X. oryzae* e *X. populi*. Recentemente Vauterin *et al.* (1995), propuseram a divisão do gênero *Xanthomonas* em 20 espécies baseados em estudos de hibridização de DNA e atividade metabólica para utilização de fontes de carbono. Assim, Vauterin *et al.* (1995) propõe as seguintes espécies: *X. fragariae*, *X. albilineans*, *X. oryzae*, *X. populi*, *X. arboricola*, *X. bromi*, *X. cassavae*, *X. codiae*, *X. cucurbitae*, *X. hortorum*, *X. hyacinthi*, *X. melonis*, *X. sacchari*, *X. theicola*, *X. pisi*, *X. translucens*, *X. vasicola*, *X. campestris*, *X. axonopodis* e *X. vesicatoria*

A classificação feita por Vauterin *et al.* (1995), alterou a classificação dos patovares. Este fato é aceitável pois, a classificação de patovar é feita de acordo com a planta hospedeira de onde a linhagem bacteriana foi isolada, sendo portanto uma classificação que tem pouco significado biológico, uma vez que, uma bactéria pode ser encontrada em uma planta, sem no entanto, estar causando doença nesta.

*X. campestris* são bactérias que tem grande importância na agricultura, por serem fitopatogênicas e, na indústria alimentícia e petroleira, por produzirem a goma xantana (Jeanes *et al.*, 1961).

*X. campestris* é o agente causador de doenças em diversos vegetais, tais como podridão negra em crucíferas, queima foliar bacteriana do arroz, mancha bacteriana do tomate e pimentão, queima bacteriana de cereais e cancro cítrico entre outros (Agrios, 1988).

## 2.1. FITOPATOGENICIDADE

Doenças em plantas podem ser definidas como um processo de funcionamento alterado de células e tecidos, decorrente de uma irritação contínua causada por um fator ambiental como por exemplo, alterações de temperatura, nutrientes no solo e luminosidade, ou serem causadas por patógenos específicos. Os principais organismos fitopatogênicos causadores de doenças em plantas incluem os fungos, bactérias, vírus, protozoários, nematóides, micoplasmas e parasitas (Agrios, 1988).

Embora as plantas estejam continuamente expostas a uma grande variedade de patógenos, somente uma pequena minoria consegue infectar uma determinada planta e causar doença. Assim, como disseram Staskawicz *et al* (1995): “resistência é a regra e suscetibilidade é a exceção”. A base dessa especificidade pela qual um patógeno causa doença numa determinada planta (hospedeira), mas não em outra (fenômeno denominado “nonhost resistance”), ainda é pouco conhecida. Estudos da interação planta-patógeno realizados em diversos sistemas, tem contudo revelado importantes aspectos de mecanismos de patogenicidade e resistência específicos, associados a processos de infecção e desenvolvimento de doença em plantas.



Quando uma planta é infectada por uma bactéria, a infecção pode tomar dois caminhos diferentes: se a planta é suscetível à bactéria, esta causa uma lesão úmida que pode se propagar pelos tecidos em decorrência do crescimento bacteriano nos espaços intercelulares, caracterizando assim uma reação de patogenicidade (interação compatível). Outra possibilidade é a de que a planta seja resistente e neste caso pode ocorrer a indução de uma resposta de hipersensibilidade (HR) caracterizando uma interação incompatível. A base genética da resistência à doença mediada por HR foi esclarecida por Flor (1971) demonstrando que a resistência do linho ao fungo *Melampsora lini* foi consequência da interação de genes do hospedeiro e do patógeno. A HR é uma reação local de defesa acompanhada de necrose local do tecido infectado (Klement & Goodman, 1967). A interação de incompatibilidade requer a presença de um locus de resistência na planta e um locus de avirulência correspondente no patógeno (Minsavage *et al.*, 1990b)

Genes diferentes numa planta particular podem conferir diferentes níveis de resistência contra um patógeno específico. Estas variações de tolerância contra patógenos e redução da capacidade de reprodução destes, diminuem o aparecimento de lesões no hospedeiro (tolerância). Porém, pressões de seleção na população de patógenos propiciam o aparecimento de novas raças patogênicas capazes de se desenvolverem em hospedeiros anteriormente resistentes. Isto sugere que patogenicidade é o resultado da aquisição de características herdadas que possibilitam associação com hospedeiro. (Chatterjee & Vidaver, 1986).

## 2.2. CLASSIFICAÇÃO DOS GENES DE PATOGENICIDADE

Os genes de patogenicidade tem sido descritos basicamente em quatro categorias: *avr* (“avirulence”), *hrp* (“hypersensitive response and pathogenicity”), *dsp* (“disease specific”) e *hsv* (“host-specific virulence”).

A especificidade raça-cultivar (patógeno-planta) é dada pelos genes do grupo *avr*. Estes genes foram descrito em *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Erwinia* e *Agrobacterium*. São genes que restringem o número de hospedeiros do patógeno. A interação planta-patógeno no caso desse grupo de genes, parece ser “gene-a-gene”, onde para um gene de *avr* específico, há um gene de resistência (R) específico na planta. Dessa interação, resulta a incompatibilidade, levando ao desenvolvimento da reação de hipersensibilidade (HR).

Os genes do grupo *hrp* têm papel tanto na patogenicidade como na resposta de hipersensibilidade em plantas hospedeiras sensíveis e plantas não hospedeiras. Os genes do grupo *dsp* estão envolvidos no desenvolvimento da doença mas não tem papel na elicitação de resposta de hipersensibilidade. Estes dois grupos foram descritos em *Xanthomonas*, *Pseudomonas* e *Erwinia*.

Os genes *hsv* determinam a especificidade de hospedeiro do patógeno. Existem poucos trabalhos feitos sobre esses tipos de genes, sendo descritos em *Xanthomonas* e *Pseudomonas*. Em *Xanthomonas*, os estudos tem sido efetuados principalmente em bactérias com amplo espectro de hospedeiros (Melano & Cooksey, 1988; Waney *et al.*, 1991).

### 2.3. GENES ENVOLVIDOS NA PATOGENICIDADE

Um dos procedimentos mais utilizados no estudo da interação bactéria-planta a nível molecular, tem sido a obtenção de linhagens mutantes que tenham sofrido alteração na expressão de alguma função ligada à patogenicidade e, a posterior complementação do mesmo com banco genômico da linhagem selvagem. Mutantes não patogênicos, devem também, crescer normalmente fora da planta, isto é, são prototróficos e apresentam sua interação com a planta prejudicada de maneira que não lhe causam sintomas observáveis (Daniels *et al.* 1987).

Para a obtenção destes mutantes podem ser utilizados métodos de mutagênese química (Daniels *et al.*, 1984; Bonas *et al.*, 1991; Hwang *et al.*, 1992); fago Mu (Mc Cammon *et al.*, 1985), transposons (Shaw *et al.*, 1988; Arlat *et al.*, 1991; Waney *et al.*, 1991; Hu *et al.*, 1992); e mutagênese sítio dirigida por "marker exchange" (Ried & Collmer, 1988; Schell *et al.*, 1988; Tang *et al.*, 1991).

Uma outra estratégia para se estudar os genes envolvidos na patogenicidade, é identificação de genes induzidos pela planta, seguida da investigação de seus papéis no desenvolvimento de sintomas de doença (Osbourn *et al.*, 1987; Beaulieu & Van Gijsegem, 1990; Kamoun & Kado, 1990).

Muitos patógenos produzem enzimas, polissacarídeos e toxinas para superar mecanismos químicos ou estruturas de defesa da planta. Estes, são considerados fatores envolvidos na patogenicidade, onde os que tem sido mais estudados são as enzimas extracelulares que degradam a parede celular ou outras estruturas, facilitando a entrada do patógeno ou dispersão no hospedeiro; e toxinas que lesam ou matam células vegetais,

permitindo que o patógeno colonize esta planta. Consideráveis evidências, sugerem que estes mecanismos são requisitos para patogenicidade básica ou fator de virulência que aumentam a severidade da doença (Keen & Staskawicz, 1988).

A identificação desses genes potencialmente relacionados com a patogenicidade pode ser efetuada através de métodos de indução de genes pela planta. A relevância destes genes na fitopatogenicidade foi examinada através da clonagem e posterior análise de seus produtos em tecidos vegetais (Daniels *et al.*, 1988; Collmer & Keen, 1986; Crecy-Lagart *et al.*; 1990; Kamoun *et al.*, 1993). Genes envolvidos na regulação da síntese destas enzimas extracelulares também têm papel importante na resposta de patogenicidade (Daniels *et al.*, 1987), assim como genes responsáveis pela exportação destas enzimas (Dow *et al.*, 1987).

Enzimas extracelulares tem um papel controverso na patogenicidade visto que em alguns casos estudados, elas são essenciais para o desenvolvimento da doença, enquanto em outros, parecem ter um papel secundário. No caso de *E. amylovora*, mutantes deficientes na produção de protease, pectinase e celulase também perderam a patogenicidade, demonstrando assim, que estas enzimas são fundamentais para o desenvolvimento da doença (Kotoujansky, 1987).

Por outro lado, em *P. solanacearum* foram isolados mutantes para as enzimas poligalacturonato liase e celulase que tinham a virulência da bactéria alterada, sem entretanto ser essencial para sua patogenicidade (Schell *et al.*, 1988; Roberts *et al.*, 1988).

O isolamento de genes para a produção de enzimas extracelulares em *X. campestris* pv. *campestris* foi relatado por Daniels *et al.* (1984) através da obtenção de

dois mutantes não patogênicos. Um desses mutantes, chamado de 8237, demonstrou-se defectivo quanto à produção de protease, poligalacturonato liase e celulase. O outro mutante mostrou envolvimento na secreção de enzimas extracelulares de *X. campestris* pv. *campestris*, mediando sua translocação através da membrana externa da bactéria (Turner *et al.*, 1985 e Dow *et al.*, 1987). Esses mesmos autores identificaram a produção de três isoenzimas de poligalacturonato liase.

A relação entre presença de enzimas extracelulares ligada à patogenicidade em de *X. campestris* pv. *campestris* não está totalmente esclarecida. Tang *et al.* (1987) e Rosato *et al.*, (1994) demonstraram que proteases extracelulares são importantes para a patogenicidade, porém não essenciais. No entanto, Dow *et al.* (1989) isolaram mutantes pleiotrópicos defectivos nas atividade pectolítica, celulolítica, proteolítica e amilolítica e observaram que estes não são afetados na patogenicidade, demonstrando que estas enzimas não tem papel na patogenicidade.

Em 1992, Hu *et al.* relataram a clonagem e caracterização de um fragmento de DNA de 4.2 kb de *X. campestris* que apresentou 3 ORFs sucessivas. A ORF3 , cuja sequência de aminoácidos codifica uma proteína de 83,5 kDa, apresentou uma homologia de 51% com o gene pulD de *Klebsiella*, que sabe-se estar envolvido em processos de secreção.

As fitotoxinas produzidos por alguns fitopatógenos são compostos tóxicos para plantas. A importância destes compostos para a patogenicidade é verificada em mutantes deficientes na produção destas toxinas que apresentam também a virulência reduzida no hospedeiro. Alguns exemplos de fitotoxinas são: tabtoxina, produzida por *P. tabaci*

(Woolley *et al.*, 1952); faseolotoxina, produzida por *P. phaseolicola* (Patil *et al.*, 1974); siringomicina e siringotoxina, produzidas por *P. siringae* (Morgan & Chatterjee, 1985).

Um outro fator que pode estar envolvido na patogenicidade seriam os polissacarídeos extracelulares (EPS) que alguns fitopatógenos produzem. Os EPS estão presentes ao redor das células de bactérias na forma de um muco viscoso ou formando uma cápsula. Em interações patogênicas entre planta-bactéria, o muco viscoso de EPS parece ter papel na virulência por obstruir o sistema vascular da planta reduzindo o transporte de água e também, por formar uma barreira ao redor da bactéria contra as defesas da planta (Chatterjee & Vidaver, 1986). Contudo, EPS não é o único fator necessário para patogenicidade, uma vez que mutantes não mucóides, os quais são altamente virulentos, tem sido isolados (Coplin & Cook, 1990).

Portanto, trabalhos que relatam a relevância de exopolissacarídeos (EPS) na patogenicidade são muito controversos. Em *E. amylovora* (Bennett & Billing, 1978) e *P. solanacearum* (Kao *et al.*, 1992) a produção de EPS tem papel fundamental na virulência. No caso de *Pseudomonas*, estes autores verificaram que EPS purificado induz sintomas de doença. Em *X. campestris*, a relação de produção de exopolissacarídeo (goma xantana) com a patogenicidade ainda não está estabelecida (Daniels *et al.*, 1988)

#### **2.4. GENES DE PATOGENICIDADE EM *X. campestris***

Com relação aos genes de patogenicidade em *X. campestris*, Turner *et al.* (1985), identificaram uma região de aproximadamente 10 kb consistindo de um "cluster" de genes envolvidos em patogenicidade. Testando produtos de "marker exchange" para

patogenicidade em plântulas de nabo, foram identificadas regiões do "cluster" clonado que eram necessárias para produção de sintomas de doença. Outras regiões contribuíram para o grau de patogenicidade (virulência) mas não foram essenciais para a produção de sintoma.

Arlat & Boucher (1991), verificaram que *X. campestris* contém um outro "cluster" de genes *hrp* de 25 kb. que estão largamente relacionados com um "cluster" *hrp* de *P. solanacearum* de 19 kb. Um mutante *hrp* de *X. campestris* pv. *campestris* foi complementado por subclones do "cluster" *hrp* de *P. solanacearum*, sugerindo a existência de alguma homologia funcional entre os "clusters" *hrp* das duas espécies. Outro fato verificado neste trabalho, foi a existência de dois conjuntos independentes de genes de patogenicidade que são regulados diferentemente, tendo em vista que estes *hrp* não foram regulados por genes que controlam a síntese de enzimas extracelulares, as quais são requeridas para patogenicidade.

O primeiro relato de genes *hsv* em *Xanthomonas* foi feito por Melano & Cooksey (1988). Estes autores isolaram mutantes de *X. campestris* pv. *translucens*, após tratamento com EMS (etilmetano sulfonado), afetados na especificidade ao hospedeiro, e verificaram uma diminuição da gama de hospedeiros susceptíveis a essa bactéria. Os autores sugeriram que genes específicos são requeridos para que a bactéria ataque cada hospedeiro tendo em vista que as mutações fizeram com que a bactéria fosse capaz de afetar alguns, mas não todos os hospedeiros.

Outro trabalho relatando genes *hsv* foi feito por Waney *et al.* (1991) através da obtenção de mutantes de *X. campestris* pv. *translucens*, afetados quanto à interação

compatível com suas plantas hospedeiras (cevada, trigo, centeio, aveia e triticale). Demonstrou-se que esses genes diferem funcionalmente dos *hrp*, uma vez que não estão envolvidos na indução de reação de hipersensibilidade em não hospedeiro e nem são requeridos no processo de virulência em plantas que não se constituam seu hospedeiro específico. Esses genes diferem também dos *avr*, pois sua presença aumenta o número de hospedeiros da bactéria e não demonstra especificidade a nível de raça-cultivar. Foi sugerido que essa classe de genes poderia ser responsável pela determinação da gama de hospedeiros de um patógeno, a nível de gênero e talvez de espécie de plantas.

### **2.5. *X. campestris* pv *vesicatoria***

*X. campestris* pv *vesicatoria* é o agente responsável pela mancha bacteriana em tomate (*Lycopersicon esculentum*) e pimentão (*Capsium anuum*) podendo causar sérias perdas na produção destas culturas, especialmente em regiões tropicais e subtropicais. Esse patógeno também causa danos em frutos, inviabilizando-os comercialmente (Cox *et al.*, 1956).

Estudos por meio de microscopia ótica e eletrônica de varredura, da infecção por *X. campestris* pv. *vesicatoria* nas folhas de tomate, determinaram que as bactérias penetram no hospedeiro através dos estômatos e se localizam e multiplicam nas câmaras subestomáticas que servem como sítios de sobrevivência. Elas podem também penetrar na planta pelas bases deterioradas dos tricomas. As bactérias colonizam os espaços intercelulares do parênquima esponjoso e alcançam as câmaras subestomáticas (não invadidas previamente), onde se multiplicam abundantemente sendo posteriormente



expulsas para os espaços intercelulares do mesófilo foliar, aglutinadas numa substância de natureza mucosa, dando origem a novas fontes de inóculo. Verificou-se desta forma, que as células bacterianas se concentram na parte inferior das folhas, onde os estômatos e câmaras subestomáticas formam o nicho ecológico preferido pelo patógeno para posterior colonização do hospedeiro (Alippi, 1992).

Os sintomas de doença da mancha bacteriana, produzidas por *X. campestris* pv vesicatoria em folhas, aparecem como pequenas manchas irregulares, com cerca de 30 mm, cinza-arroxeadas, com o centro preto e halo de clorose. As lesões podem coalescer, levando à desfoliação ou fazer com que as folhas pareçam quebradiças. Em frutas verdes, aparecem inicialmente pequenos pontos encharcados, levemente salientes, com halos amarelados, atingindo de 3-6 mm. Em seguida os halos desaparecem e as manchas se tornam marron-escuras, com superfície irregular, corticosa (Agrios, 1988).

O papel das enzimas extracelulares na patogenicidade de *X. campestris* pv vesicatoria foi estudado por Seal *et al.* (1990). Esses autores descreveram o isolamento de um mutante não patogênico de *X. campestris* pv.vesicatoria. Este mutante produz normalmente as enzimas extracelulares, sugerindo que tais enzimas não são essenciais na patogenicidade. Uma comprovação deste fato foi relatada por Beaulieu *et al* (1991). Estes autores verificaram que a produção de enzimas pécticas não tem papel na patogenicidade desde que mutantes para produção de pectinase não mostraram alteração na patogenicidade. Estes autores também relataram neste trabalho ocorrência de uma variação na porcentagem de linhagens produtoras da enzima de acordo com a região geográfica de isolamento.

A divisão de *X. campestris* pv. *vesicatoria* quanto à especificidade de hospedeiro foi discutida por vários autores. Reifshneider *et al.* (1985), propuseram a divisão de *X. campestris* pv. *vesicatoria* em três grupos de *avr*, de acordo com a virulência para tomate e/ou pimentão, sendo eles: *XcvT*, virulenta somente em tomate; *XcvP*, virulenta apenas em pimentão; *XcvPT*, virulenta para ambos os hospedeiros.

Uma outra classificação do patovar *vesicatoria*, em grupo A e B, foi proposta por vários autores (Bouzar *et al.*, 1993; Bouzar *et al.*, 1994 e Stall *et al.*, 1994), levando-se em consideração características fenotípicas como atividade amilolítica, atividade pectolítica e perfil eletroforético de proteínas.

Vauterin *et al.* (1995) propôs outra classificação, onde bactérias do grupo A passariam a pertencer a espécie *X. axonopodis* e as bactérias do grupo B passariam a pertencer a espécie *X. vesicatoria*

Em *X. campestris* pv. *vesicatoria*, existe também uma divisão em raças distintas, de acordo com a capacidade de indução de sintomas ou reação de hipersensibilidade em plantas de tomate e em diferentes cultivares de pimentão. A resistência da planta a um patógeno depende da interação entre genes específicos de ambos, manifestando-se quando um gene dominante de resistência da planta interage com um gene dominante de avirulência do patógeno (Coplin, 1989).

Coplin (1989), descreveu três genes de resistência a *X. campestris* pv. *vesicatoria* em pimentão: Bs1, Bs2 e Bs3 que interagem respectivamente com os locus *avrBs1*, *avrBs2* e *avrBs3* de *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

O gene *avrBs1* foi clonado (Swason *et al.*, 1988) e sequenciado (Ronald & Staskawicz, 1988). Esse gene codifica uma proteína de 50 kDa, AvrBs1 que é necessária para a elicitação de HR em hospedeiros resistentes, e está situado em um plasmídeo conjugativo de aproximadamente 193 kb.

Outro gene *avrBs3* de *avr* de *X. campestris* pv. *vesicatoria* também está localizado em um plasmídeo. O fragmento de 3.7 kb que contém o gene *avrBs3* foi sequenciado, sendo encontrado inúmeras sequências repetidas invertidas de 102 pb. O gene *avrBs3* codifica uma proteína de 122 kDa que parece ser reconhecida diretamente pelos genes de resistência da planta resultando na HR (Bonas *et al.*, 1989). No entanto, este mecanismo ainda permanece desconhecido.

Kearney & Staskawicz (1990) demonstraram que o locus *avrBs2* é cromossômico e através de hibridização com outros patovares de *X. campestris*, verificou-se que o gene *avrBs2* é altamente conservado, criando perspectivas quanto ao uso do gene de resistência correspondente, Bs2, no controle de várias doenças causadas por esse gênero em diferentes plantas.

Um quarto gene de avirulência em *X. campestris* pv. *vesicatoria*, responsável por determinar reação incompatível com cultivares de pimentão e reação compatível somente com plantas de tomate, designado *avrBsT*, foi clonado (Minsavage *et al.* 1990b). Posteriormente, Canteros *et al.* (1991) identificaram um quinto locus que apresentava reação compatível com pimentão, mas não com tomate. Este gene, designado *avrBsP*, apresentou homologia com o gene *avrBs3*.

A indução da resposta de hipersensibilidade em não hospedeiro tem sido correlacionada à presença de genes *hrp*, os quais apresentam função nas interações compatíveis com o hospedeiro (patogenicidade) e incompatível (hipersensibilidade) com não hospedeiros. Tem sido demonstrado que esses genes, estão organizados em longos "clusters" no genoma de vários fitopatógenos.

Bonas *et al.* (1991) isolaram genes *hrp* de *X. campestris* pv. vesicatoria, demonstrando que seis locus *hrp*, designados *hrpA* à *hrpF*, encontram-se organizados num "cluster" de cerca de 25 kb. Os autores demonstraram também que essa sequência hibridizou com vários patovares de *X. campestris* estudados.

Fenselau *et al.* (1992) analisaram três locus *hrp* de *X. campestris* pv. vesicatoria. Foi encontrado grande similaridade entre proteínas *hrp* de *Xanthomonas* e proteínas de *Yersinia*, *Shigella flexneri*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* e *Caulobacter crescentus*. Proteínas codificadas por genes de *X. campestris* pv. vesicatoria loci *hrpA*, *hrpB* e *hrpC* são similares a ATPases de várias espécies de *Yersinia* as quais estão envolvidas em secreção da proteína Yop. Baseados nas funções dessas proteínas homólogas de *hrp*, os autores propuseram um modelo de funcionamento desses genes, segundo o qual, pelo menos parte dos genes *hrp* organizados no "cluster" de *X. campestris* pv. vesicatoria devem fazer parte de um sistema de secreção requerido para a patogenicidade em *Xanthomonas*.

Schulte & Bonas (1992) estudaram a expressão genes *hrp* de *X. campestris* pv. vesicatoria. Experimentos de hibridização, mostraram que RNAs correspondentes à região *hrp* foram detectados depois que a bactéria cresceu na planta. Nenhuma expressão

foi observada após o crescimento da bactéria em meio complexo. A indução de genes *hrp* na planta foi confirmada com a utilização do gene  $\beta$ -glucuronidase (*gus A*). Estes autores demonstraram que filtrados de suspensões de células de plantas de tomate, tabaco e pimentão estimularam a expressão desses genes, porém a molécula(s) indutora(s) ainda não é conhecida, sabe-se apenas que ela é termo-estável, hidrofílica e seu peso molecular é menor que 1000 daltons.

São poucos os genes *dsp* descritos na literatura. Em *X. campestris* pv. *vesicatoria* foi descrito apenas um gene *dsp* até o momento (Seal *et al.*, 1990). Esses autores, através de mutagênese com Tn5, isolaram um mutante não patogênico que induziu reação de hipersensibilidade em tabaco. Esse mutante foi complementado com o banco genômico de linhagem selvagem, permitindo a identificação de uma região de 22 kb envolvida na patogenicidade de *X. campestris* pv. *vesicatoria*

A clonagem de um fragmento de DNA envolvido no reconhecimento de hospedeiros (*hsv*) em *X. campestris* pv. *vesicatoria* foi descrito por Gonçalves (1996). O clone que normalmente reconheceria somente mandioca passou a reconhecer também o tomate como hospedeiro.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. LINHAGENS BACTERIANAS E PLASMÍDIOS

As linhagens de *X. campestris*, *Escherichia coli* e os plasmídios utilizados neste trabalho estão relacionados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1- Linhagens de bactérias utilizadas

Linhagem	Características	Fonte ou referência
<i>X. campestris</i>		
pv vesicatoria	patógeno de tomate e pimentão	
479	linhagem selvagem	SBF, IB*
479N <sup>r</sup>	mutante espontâneo derivado da linhagem 479	SBF, IB*
7	mutante não patogênico derivado da linhagem 479 Nal <sup>r</sup>	Marques, 1992
7/pVE41	mutante complementado com pVE41	Marques, 1992
7/pVE42	mutante complementado com pVE42	Marques, 1992
7/VE43	mutante complementado com pVE43	Marques, 1992
7/pVE44	mutante complementado com pVE44	Marques, 1992
317	tipo selvagem	SBF, IB*
317/pUFR027	317+pUFR027	Este trabalho
317/pVE41	317+pVE41	Este trabalho
pv. manihotis	patógeno para mandioca	Este trabalho
289	tipo selvagem	SBF, IB*
289N <sup>r</sup>	mutante espontâneo derivado da linhagem 289	SBF, IB*

Tabela 1:continuação

Linhagem	Características	Fonte ou referência
289N <sup>f</sup> /pUFR027	289N <sup>f</sup> + pUFR027	Este trabalho
289N <sup>f</sup> /pVE41	289N <sup>f</sup> + pVE41	Este trabalho
pv. phaseoli	patógeno para feijão	
558	tipo selvagem	SBF, IB*
558/pUFR027	558+pUFR027	Este trabalho
558/pVE41	558+pVE41	Este trabalho
pv. glycines	patógeno para soja	
333	tipo selvagem	SBF, IB*
333/pUFR027	333+pUFR027	Este trabalho
333/pVE41	333+pVE41	Este trabalho
pv. citri	patógeno para citros	
223	tipo selvagem	SBF, IB*
223/pUFR027	223+pUFR027	Este trabalho
223/pVE41	223+pVE41	Este trabalho
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 $\alpha$	<i>supE</i> 44, <i>lacU</i> 169 ( $\phi$ 80 <i>lacZ</i> M15), <i>hsd</i> R17, <i>recA</i> 1, <i>endA</i> 1, <i>gyrA</i> 96, <i>thi</i> - 1, <i>relA</i> 1	Bethesda Research Laboratories
clones		
VE41	DH5 $\alpha$ +pVE41	Marques, 1992
VE42	DH5 $\alpha$ +pVE42	Marques, 1992
VE43	DH5 $\alpha$ +pVE43	Marques, 1992
VE44	DH5 $\alpha$ +pVE44	Marques, 1992
subclones		
KSH05	DH5 $\alpha$ +pVE05	Este trabalho
KSH15	DH5 $\alpha$ +pVE15	Este trabalho
KSH20	DH5 $\alpha$ +pVE20	Este trabalho

\*Seção de Bacteriologia Fitopatológica, Instituto Biológico, Campinas, SP.

Tabela 2. Plasmídios utilizados

Plasmídio	Características	Fonte
pUFR027	<i>IncW</i> , <i>km<sup>F</sup></i> , <i>mob</i> , <i>lacZa<sup>F</sup></i> , <i>par<sup>F</sup></i>	De Feyter <i>et al.</i> , 1990
pVE41	pUFR027 contendo um fragmento de DNA genômico de ~4kb (EE41) proveniente de <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> 317	Marques, 1992
pVE42	pUFR027 contendo um fragmento de DNA genômico de ~4kb proveniente de <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> 317	Marques, 1992
pVE43	pUFR027 contendo um fragmento de DNA genômico de ~3kb proveniente de <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> 317	Marques, 1992
pVE44	pUFR027 contendo um fragmento de DNA genômico de ~5kb proveniente de <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> 317	Marques, 1992
pBluescript KS+	<i>amp<sup>F</sup></i>	Stratagene
pKS41	pBluescript KS+ contendo um fragmento de DNA genômico de ~ 4kb (EE41) proveniente de <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> 317	Este trabalho
pKSH05	pBluescrit KS+ contendo um fragmento de DNA genômico de ~ 0.5 kb proveniente de EE41	Este trabalho
pKSH15	pBluescrit KS+ contendo um fragmento de DNA genômico de ~ 1.5 kb proveniente de EE41	Este trabalho
pKSH20	pBluescrit KS+ contendo um fragmento de DNA genômico de ~ 2.0 kb proveniente de EE41	Este trabalho
pVE05	pUFR027 contendo um fragmento de DNA genômico de ~ 0.5 kb proveniente de EE41	Este trabalho
pVE15	pUFR027 contendo um fragmento de DNA genômico de ~ 1.5 kb proveniente de EE41	Este trabalho
pVE20	pUFR027 contendo um fragmento de DNA genômico de ~ 2.0 kb proveniente de EE41	Este trabalho



### 3.2. PLANTAS UTILIZADAS

As plantas hospedeiras utilizadas para a realização dos testes de patogenicidade foram: tomate (*Lycopersicon esculentum*) cultivar Petomech VF 162, procedente da Petoseed Co., pimentão (*Capsicum annum*) procedente da Agroflora, feijão (*Phaseolus vulgaris*) variedade carioquinha (procedência comercial), soja (*Glycine max*) variedade Santa Clara e mandioca (*Manihotis esculentum*) variedade Cigana Beni.

Para os testes de hipersensibilidade, foram utilizadas plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) cultivar Petit Havana SR1.

### 3.3 MEIOS DE CULTURA

3.3.1. NYGB (meio líquido completo) e NYGA (meio sólido completo) (Turner *et al.*, 1984) foram utilizados para o crescimento de *Xanthomonas* à 28° C.

Peptona	5,0 g
Estrato de levedura	3,0 g
Glicerol	20,0 g
Água q.s.p. 1000 ml	

O meio sólido completo foi preparado acrescentando-se 1% de ágar ao NYGB.

3.3.2. LB de acordo com Sambrook *et al.* (1989) foi utilizado para o crescimento de *E. coli* à 37° C.

Triptona	10,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
NaCl	10,0 g
Água q.s.p. 1000 ml	

O pH do meio foi ajustado para 7.5 com NaOH e autoclavado a 120°C por 20 minutos.

3.3.3. MS de acordo com Murashigue & Skoog (1962) foi utilizado para a germinação das sementes.

Solução de macronutrientes	25,0 ml
Solução de micronutrientes	0,5 ml
Vitaminas	0,5 ml
Fe-EDTA	2,5 ml
Ágar	10,0 ml
Água q.s.p. 1000 ml	

O pH do meio foi ajustado para 5.7 com NaOH e autoclavado a 120°C por 20 minutos.

-Solução de macronutrientes

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	15,5 g/l
KNO <sub>3</sub>	19,0 g/l
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	4,4 g/l
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3,7 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,7 g/l

-Solução de micronutrientes

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2 g/l
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	21,7 g/l
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	9,1 g/l
KI	0,83 g/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25 g/l
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025 g/l
CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025 g/l

3.3.4. MPI de acordo com Sow & Demain (1979) foi utilizado como meio para

fermentação	
Sacarose	20,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,0 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g
NH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0 g
Ácido cítrico	2,0 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,0006 g
ZnO <sub>2</sub>	0,0006 g
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0024 g
CaCo <sub>3</sub>	0,02 g
HCl	0,13 g
Água q.s.p. 1000 ml	

3.3.5. Meios de detecção de enzimas extracelulares

-Meio para detecção de atividade proteolítica (Tang *et al.* 1987).

A atividade proteolítica foi determinada pela formação de halo de degradação de proteínas do leite em placas de meio de cultura NYGA contendo 2% de leite desnatado

-Meio para detecção de atividade amilolítica

Ao meio NYGA acrescentou-se amido solúvel 0,2%. A revelação foi realizada com vapor de iodo, permitindo a visualização dos halos formados pelas colônias positivas.

-Meio para detecção de atividade celulolítica (Bocarra *et al.*, 1988)

meio M9 q.s.p. 1000 ml	
Glicerol	5,0 g
Carboximetilcelulose	5,0 g
Extrato de levedura	1,0 g
Ágar	15,0 g

O pH foi ajustado para 7.0 e autoclavado a 120°C por 20 minutos.

A revelação foi realizada no terceiro dia de crescimento das bactérias testadas através de detecção de halos das colônias positivas após coloração com vermelho congo na concentração de 0,1%.

-Meio M9	
sais de M9	200 ml
Glicerol 20%	20 ml
Água q.s.p. 1000 ml	

A solução foi autoclavada a 120°C por 20 minutos

-Sais M9	
Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,56 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,60 g
NaCl	0,10 g
NH <sub>4</sub> Cl	0,20 g
Água q.s.p. 200 ml	

-Meio para detecção de atividade pectolítica (Bocarra *et al.*, 1988 com modificação do substrato utilizado)

Meio M9 q.s.p. 1000 ml	
Glicerol	5,0 g
Extrato de levedura	1,0 g
Pectina cítrica	5,0 g
Ágar	15,0 g

O pH do meio foi ajustado para 7.0 e autoclavado a 120°C por 20 minutos.

A revelação foi realizada, após o terceiro dia de crescimento das bactérias, pela adição de brometo de hexadeciltrimetil amônia na concentração de 1% sobre o meio de cultura contendo as colônias, onde se observou o aparecimento de halos com precipitado.

### 3.3.6. Antibióticos

A concentração de 50 µg/ml foi utilizada para o antibiótico ácido nalidíxico (Nal), canamicina (Km), espectinomomicina (Sp), e estreptomicina (Sm), de 30 µg/ml para ampicilina (Ap) e 5 µg/ml para gentamicina (Gm). Em meio líquido, utilizou-se a metade destas concentrações.

## 3.4. Teste de patogenicidade

### 3.4.1. Teste em sementes (Gough *et al.*, 1988)

A descontaminação das sementes foi realizada mergulhando-as em 10 ml de água esterilizada com uma gota de detergente comum por 5 minutos. Após este tempo, as sementes foram lavadas com uma solução de hipoclorito de sódio (10% v/v) seguido de sucessivas lavagens com água destilada esterilizada até a completa retirada do detergente e do hipoclorito.

As linhagens de bactéria a serem testadas foram crescidas em meio NYGB sob agitação durante 16 horas. As culturas foram centrifugadas e suspensas em salina. A absorbância da solução foi ajustada para 0.2 ( $A_{600}$ ). As sementes foram submersas na solução de bactérias por 1 hora sob agitação suave à 28° C. Em seguida, foram secas em papel de filtro e transferidas para formas de mini gelo com meio MS e colocadas para germinar em câmara com fotoperíodo de 8 hr no escuro à 25° C

Quando as plântulas tratadas começaram a apresentar sintomas de patogenicidade, iniciou-se a contagem de número de plântulas com sintoma de doença e a retirada de amostras para a contagem de número de células de bactérias por plântula. Três amostras foram retiradas aleatoriamente, durante 4 dias, maceradas em 1 ml de salina, diluídas e plaqueadas em meio NYGA com antibióticos.

#### 3.4.2. Teste em folhas de plantas adultas (Niepold *et al.*, 1985)

Plantas com cerca de 30 cm de comprimento foram cobertas com sacos plásticos, levadas ao laboratório e molhadas em abundância 24 horas antes da inoculação. Culturas de bactérias crescidas durante 16 horas em meio líquido sob agitação foram centrifugadas e suspensas em salina. A absorbância das soluções foram ajustadas para 0.5 ( $A_{600}$ ). Com uso de seringas hipodérmicas estas soluções foram inoculadas em toda a folha. As plantas foram mantidas no laboratório sob luz e temperatura ambiente. Os resultados referentes a evolução dos sintomas foram anotados por 5 dias após a inoculação.

#### 3.4.3. Teste em plântulas (Daniels *et al.*, 1984)

Sementes foram descontaminadas seguindo-se os passos descritos no item 3.4.1, em seguida, colocadas em formas de mini gelo, onde germinaram e cresceram por 5 dias. Plântulas com 10 cm de comprimento foram inoculadas com colônias de bactérias provindas de placas através de um estilete esterilizado. A inoculação foi feita mergulhando-se a ponta do estilete esterilizado na colônia seguido da perfuração do caule da plântula. Após a inoculação, as caixas contendo as plântulas foram colocadas em outras caixas e embaladas em sacos plásticos de forma a manter a umidade. Logo após a inoculação, retirou-se três plântulas para o tempo zero que foram maceradas, homogeneizadas, diluídas e plaqueadas em meio sólido. As amostras foram retiradas durante 72 hs em intervalos de 24 hs.

#### 3.4.4. Teste em hipocótilo (Marques & Rosato, 1995)

Os caules de plântulas com 10 cm de comprimento foram cortados em vários fragmentos de 1 cm com auxílio de uma tesoura cirúrgica e pinça esterilizadas. Os hipocótilos foram mergulhados em suspensão bacteriana ( $DO 0.2 A_{600}$ ) preparada a partir de culturas crescidas em NYGB durante 16 horas. Em seguida, os hipocótilos foram colocados em placas de Petri contendo meio ágar água, as quais, foram mantidas em

estufa à 28° C por 72 horas. Logo após a inoculação, três amostras foram retiradas para tempo zero, maceradas, homogeneizadas, diluídas e plaqueadas em meio sólido. As amostras foram retiradas durante 72 horas em intervalos de 24 hs.

#### 3.4.5. Teste de hipersensibilidade em tabaco.

Plantas de tabaco com 30 cm de altura foram trazidas ao laboratório, umedecidas em abundância e cobertas com um saco plástico 24 hs antes da inoculação. Culturas de bactérias foram crescidas durante 16 horas em meio líquido sob agitação a 28° C, centrifugadas e suspendidas em salina. As absorbâncias das culturas foram ajustadas para 0.5 ( $A_{600}$ ). Estas suspensões foram infiltradas nas folhas de tabaco com uso de seringas hipodérmicas. Após a infiltração, as plantas foram mantidas no laboratório sob luz e temperatura ambiente. Os resultados foram avaliados diariamente durante três dias após a inoculação.

### 3.5. ELETROPORAÇÃO

As células de *X. campestris* foram preparadas segundo metodologia utilizada por White & Gonzales (1991) modificado por Ferreira *et al.* (1995). Após crescer as bactérias durante 16 horas, 1 ml destas culturas foram transferidas para 100 ml de NYGB e incubadas até a fase mid-log, com absorbância ajustada entre 0,5 a 0,65 ( $A_{640}$ ). Esta cultura foi centrifugada a 3500 rpm por 15 minutos a 4° C, sendo o sedimento lavado 2 vezes em água destilada esterilizada gelada e suspendida em 30 ml de glicerol 10 % gelado. Os passos de suspensão e centrifugação foram repetidos por duas vezes, sendo o volume final de glicerol 10 % igual a 10 ml. Aliquotas de 60µl de células foram passadas em tubos de microcentrífuga previamente resfriados, onde foi adicionado o DNA. A mistura foi transferida para cubeta gelada de 0,1 cm e colocada na câmara do aparelho *E coli* Pulser (BioRad). Foram utilizados pulsos de 12-18 KV/cm com duração de 5

milissegundos. Imediatamente após o pulso, foi adicionado 1 ml de meio líquido NYGB e as culturas foram incubadas por uma hora, sob agitação a 28° C. Alíquotas de 100µl foram plaqueadas em meio seletivo.

### 3.6. ANÁLISE DE PROTEÍNAS TOTAIS

Proteínas totais das linhagens de *X. c. pv. vesicatoria* foram extraídas e o perfil de proteínas foi analisado através de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

#### 3.6.1. Extração de proteínas totais (Vauterin et al., 1991)

As linhagens de bactérias foram crescidas em meio NYGB por 16 horas. Centrifugou-se 1,5 ml de cultura por 2 minutos a 12000 rpm em microcentrífuga. O sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em tampão de lise (0,6mM Tris-HCL, pH 6.8; 5% β-Mercaptoetanol; 10% glicerol ; 2.8% de SDS). A relação entre volume de tampão de lise e massa de bactérias foi de 180 µl de tampão por 20 mg de sedimento celular. Esta solução foi fervida em banho maria por 10 minutos e centrifugada por 3 minutos a 12000 rpm onde recuperou-se o sobrenadante que foi utilizado como amostra no gel de poliacrilamida.

#### 3.6.2. Gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE).

-gel de empacotamento 4%	
Acrilamida: Bis-acrilamida (30:0.8, V/V)	0,9 ml
Tris-Hcl 1M, pH 6.8	0,9 ml
Água	4,8 ml
SDS 10%	75 µl
Temed	20 µl
Persulfato da amônio*	0,35 ml



-gel de resolução 10%	
Acrilamida: Bis-acrilamida (30:0,8, V:V)	5 ml
Tris-HCl, pH 8.8	5,9 ml
Água	3,6 ml
SDS 10%	150µl
Temed	20 µl
Persulfato de amônio*	0,75 ml

-\*colocar no final da reação

Após as amostras serem aplicadas, o gel foi submetido a 70V até o tampão de amostra atingir o gel de resolução e, a seguir, a 140V até o final do gel, a temperatura ambiente, em tampão Tris-glicina (Tris base 25mM, glicina 0,192 mM e SDS 0,1%, pH 8.3). O marcador de peso molecular utilizado foi o “mid-range protein MW marker” (Promega).

### 3.6.3. Coloração das proteínas por impregnação com prata

A coloração das proteínas foi efetuada segundo Blum *et al.* (1987), modificado (Tabela 3). As soluções foram preparadas imediatamente antes do uso.

Tabela 3. Tratamento do gel de poliacrilamida para coloração com prata

Soluções	Tempo de tratamento
Fixadora (etanol 50%, ácido acético 12%, 50ml/l de formaldeído 37%)	>1 h
Etanol 50%	3 x 20 min
solução de pré-tratamento (tiosulfato de sódio 0,2%)	1 min
Água destilada	3 X 20 s
Solução de impregnação (nitrate de prata, 0,2%; 0,75ml/l de formaldeído 37%)	20 min
Água destilada	3 x 20 s
Solução reveladora (carbonato de sódio 6%;, tiosulfato de sódio 0,4 mg%; 0,5 ml/l de formaldeído 37%)	até o aparecimento das bandas
Solução de bloqueio (etanol 50%, ácido acético 12 %)	

### 3.7. PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS (GOMA XANTANA)

As linhagens bacterianas a serem testadas foram crescidas em meio NYGB durante 16 horas. A densidade óptica foi ajustada para 1 ( $A_{640}$ ) e 2 ml desta cultura foram inoculados em 20 ml de meio de produção I (MPI) e incubado por 72 horas em shaker a 28° C. A viscosidade do caldo foi medida através de viscosímetro da marca Brookfield modelo RTV, utilizando-se spindle 21 e rotações de 20, 50 e 100 rpm.

### 3.8. MANIPULAÇÃO DO DNA

#### 3.8.1. Extração de DNA

As extrações de DNA plasmidial foram efetuadas segundo o método de lise alcalina (Birnboim & Doly, 1979) com modificações descritas por Sambrook *et al.* (1989).

A extração de DNA total foi realizada segundo o método descrito por Goss *et al.*, (1990), com modificações.

Apartir de uma cultura de bactéria crescida durante 16 horas, centrifugou-se cerca de 3 ml; o sedimento foi lavado duas vezes em tampão TES modificado (50mM Tris-HCl pH 8.0; 50 mM EDTA; 150 mM NaCl) e suspenso no mesmo tampão. Adicionou-se 150 µg/ml de proteinase K e 1% de SDS e incubou-se por 1 hora à 50°C. Posteriormente o material foi limpo com duas extrações de fenol clorofórmio e uma com clorofórmio, a concentração final de sal foi acertada para 30mM com acetato de sódio 3M sendo então, precipitado com dois volumes de etanol absoluto. O DNA foi suspenso em 3 ml de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0 e 1 mM EDTA) e dialisado contra o mesmo tampão por 48 horas. A solução contendo o DNA foi concentrada com polietilenoglicol (PEG).

### 3.8.2. Ligação e transformação

O sistema de ligação foi preparado de forma que os fragmentos a serem clonados estivessem numa proporção de 3:1. A enzima T4 DNA ligase (BRL), foi utilizada segundo especificações do fabricante.

A transformação foi realizada utilizando-se células competentes da linhagem DH5 $\alpha$  de *E. coli* preservadas a -70 $^{\circ}$  C, segundo metodologia descrita por Sambrook *et al.* (1989). As células transformadas foram selecionadas por resistência ao antibiótico do vetor, e as colônias contendo inserto foram identificadas por seleção em placas contendo X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosídeo). As colônias brancas foram isoladas e transferidas para placas contendo meio LB sólido contendo o antibiótico apropriado.

### 3.8.3. Hibridização

DNA total de linhagens de *X. campestris* foram digeridos com *EcoRI* e os fragmentos obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose 0.8%, transferidos para membrana de nylon através do método de transferência alcalina de Southern Blotting (Sambrook *et al.*, 1989). As membranas foram hibridizadas com o fragmento de 4 kb *EcoRI* contido no plasmídeo pVE41. Esse fragmento, designado EE41, foi marcado utilizando-se a reação de digoxigenina de acordo com as instruções do fabricante (boehringer-Mannheim FRG). As membranas foram pré-hibridizadas por 4 horas e hibridizadas por 16 horas, ambas a 42 $^{\circ}$ C em 50% de formamida. Após a hibridização, a membrana foi lavada por 1 minuto com SSC 2X (NaCl 0,3M; citrato trissódico 0,03M) e 0,5% SDS; seguindo-se duas lavagens de 15 minutos com SSC 2X e 0,1% SDS; duas lavagens de 20 minutos com SSC 0,1X e 0,1% SDS à 60 $^{\circ}$ C e uma lavagem momentânea com SSC 1X. A revelação da hibridização foi feita por detecção imunológica utilizando-se anticorpo conjugado (anti-digoxigenina) e CSPD (Boehringer-Mannheim, FRG) detectada em filmes de raio-X Fuji (Fuji Medical X-Ray Film).

### 3.9. Subclonagem do fragmento EE41

O plasmídeo pVE41, contendo o fragmento EE41 foi digerido com a enzima *EcoRI* por 1 hora. O fragmento EE41 foi liberado do vetor pUFR027, purificado do gel e ligado no vetor pBluescript KS+, previamente digerido com *EcoRI*. Esse novo plasmídeo, designado KS41 foi digerido com a enzima *HindIII*. Desta digestão obteve-se um fragmento de ~0,5 kb ligado ao vetor que foi recircularizado sendo denominado pKSH05; um fragmento de ~1,5 kb e um fragmento de ~2 kb. Os fragmentos de 1,5 kb e 2 kb foram ligados no vetor pBluescript KS+, sendo denominados pKSH15 e pKSH20, respectivamente.

O pKSH15 e pKSH20 foram utilizados para obtenção de outros subclones através da deleção unidirecional da extremidade 5'protuberante pelo método de Henikoff (1987). Estes novos subclones foram utilizados nas reações de sequenciamento de DNA.

Para obter a extremidade 5'protuberante, aproximadamente 20 µg de DNA do pKSH20 foram digeridos com a enzima *EcoRI*. Após a digestão, a enzima foi extraída com fenol:clorofórmio (1:1) e clorofórmio; posteriormente o DNA foi digerido com *SacI* para se obter uma extremidade 3'protuberante e com isto protegê-la da ação da exonuclease. A enzima foi extraída pelo mesmo método descrito acima. O DNA foi precipitado com 0,1 volume de NaCl 2 M e 2 volumes de etanol e suspenso em tampão da exonuclease III (Tris-HCl 66 mM pH8.0; MgCl<sub>2</sub>0,66mM). A concentração de exonuclease III foi de 500 U e S1 nuclease, 60U. A reação foi realizada à 37°C e foram retiradas amostras de 30 em 30 segundos num total de 25 alíquotas.

Para o pKSH15 foi utilizada a enzima *Bam*HI para obtenção da extremidade 5'protuberante e os passos seguintes foram os mesmos descritos acima.

### 3.10. SEQUENCIAMENTO DE DNA

O pKSH15 e pKSH20 foram utilizados para obtenção de outros subclones através da deleção unidirecional da extremidade 5'protuberante pelo método de Henikoff (1987). Estes novos subclones, juntamente com o subclone pKSH05, foram utilizados nas reações de sequenciamento de DNA.

Para obter a extremidade 5'protuberante, aproximadamente 20 µg de DNA do pKSH20 foram digeridos com a enzima *Eco*RI. Após a digestão, a enzima foi extraída com fenol:clorofórmio (1:1) e clorofórmio; posteriormente o DNA foi digerido com *Sac*I para se obter uma extremidade 3'protuberante e com isto protegê-la da ação da exonuclease. A enzima foi extraída pelo mesmo método descrito acima. O DNA foi sedimentado com 0,1 volume de NaCl 2 M e 2 volumes de etanol e suspenso em tampão da exonuclease III (Tris-HCl 66 mM pH8.0; MgCl<sub>2</sub>0,66mM). A concentração de exonuclease III foi de 500 U e S1 nuclease, 60U. A reação foi realizada à 37°C e foram retiradas amostras de 30 em 30 segundos num total de 25 alíquotas.

Para o pKSH15 foi utilizada a enzima *Bam*HI para obtenção da extremidade 5'protuberante e os passos seguintes foram os mesmos descritos acima.

Reações de sequenciamento foram feitas utilizando o Kit "T7 sequencing" da Pharmacia Biotech de acordo com as especificações do fabricante. Os primers utilizados

foram o “M13 reverse sequence primer” da Pharmacia Biotech e o “M13-pUC forward amplification primer” da Gibco BRL. Para a marcação da reação foi utilizado o nucleotídeo adenosina trifosfatado marcado com enxofre radioativo ( $S^{35}$ ).

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 5% (para sequências longas) e 6% (para sequências curtas) , em tampão TBE (Tris-HCL 89mM; EDTA 2,5mM; ácido bórico 89mM, pH 8,3) (Sambrook, *et al*, 1989). Após a corrida, os géis foram fixados nas placas previamente tratadas com "bind-silane" (Sigma), sendo mantidos em solução de 10% de metanol : ácido acético por 30 minutos e hidratados em água corrente. Depois da secagem em estufa, filmes de autorradiografia (Hyperfilm -MP, Amersham) foram colocados sobre géis e os sistemas mantidos no escuro entre 4 e 7 dias, sendo revelados a seguir.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DOS CLONES VE41, VE42, VE43 E VE44**

A linhagem *X. campestris* pv. vesicatoria 479 foi mutagenizada com NTG e um mutante (mutante 7) foi selecionado por não produzir sintomas de doença em tomate e pimentão. Os clones VE41, VE42, VE43 e VE44 foram obtidos após complementação do mutante 7 com o banco genômico da linhagem *X. campestris* pv. vesicatoria 317. Estes clones foram selecionados por restaurar a patogenicidade do mutante 7 (Marques, 1992).

#### **4.1.1. Determinação do tamanho dos insertos dos clones contidos nos plasmídios pVEs**

O tamanho dos insertos dos plasmídios pVE41, pVE42, pVE43 e pVE44 foram verificados após extração plasmidial e digestão com a enzima *EcoRI* (Fig. 1)

Os plasmídios pVE41, pVE42 e pVE43 apresentaram insertos de aproximadamente 4 kb e o pVE44 de aproximadamente 5 kb. Este resultado não concordou com o obtido por Marques (1992) que era de 3 kb para o pVE43.

#### **4.1.2 Testes de patogenicidade dos mutantes complementados 7/pVE41, 7/pVE42, 7/pVE43 e 7/pVE44**

Nos testes de patogenicidade, foram utilizados os mutantes complementados 7/pVE41, 7/pVE42, 7/pVE43 e 7/pVE44.

Para os testes em semente, hipocótilo e plântula, utilizou-se as linhagens *X. campestris* pv vesicatoria 317 como controle positivo, *X. campestris* pv manihotis 289 como controle negativo, o mutante 7 e os mutantes complementados 7/pVE41, 7/pVE42, 7/pVE43 e 7/pVE44.

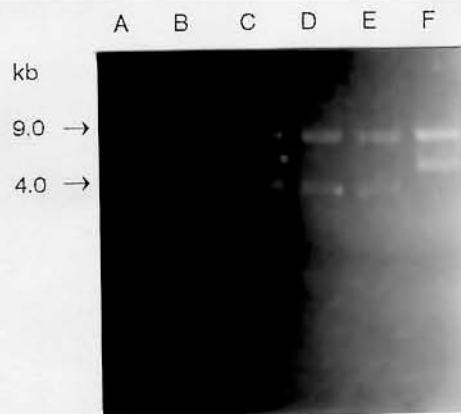


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos plasmídios pVEs. a)ladder 1.0 kb (BRL), b)vetor pUFR027, c)pVE41, d)pVE42, e)pVE43 e f)pVE44



Os mutantes complementados 7/pVE42, 7/pVE43 e 7/pVE44 apresentaram variações nos testes de patogenicidade em semente, hipocótilo e plântula. O mutante 7/pVE42 causou sintomas em 100% das plântulas no teste em semente, 68% no teste em hipocótilo e 42,2% no teste em plântula. O mutante 7/pVE43 apresentou 100% de plântulas afetadas no teste em semente, 50% no teste em hipocótilo e 99% no teste em plântula. O mutante 7/pVE44 apresentou 96,4% de plântulas afetadas no teste em semente, 78% no teste em hipocótilo e 89% no teste em plântula (Tab. 4).

No teste em semente, verificou-se que o mutante complementado 7/pVE41 foi capaz de induzir sintomas de doença em 96% das plântulas inoculadas (Fig. 2). No teste em hipocótilo, verificou-se que 92% dos hipocótilos desenvolveram sintomas de doença (Fig. 3). No teste em plântula, verificou-se 95% das plântulas com sintomas de doença (Fig. 4). Os resultados similares obtidos nos três testes, para este mutante complementado, contrastando com os resultados variáveis obtidos para os demais mutantes, levou-nos a selecionar o mutante complementado 7/pVE41 para uma análise mais detalhada.

#### 4.1.3. Hibridização

O plasmídio pVE41 foi extraído, digerido com *EcoRI*, e o inserto de 4.0 kb (EE41) foi utilizado como sonda para a hibridização do DNA total das linhagens *X. campestris* pv vesicatoria 317 e 479 e dos plasmídios KS41, pVE41, pVE42, pVE43 e pVE44, digeridos com *EcoRI*, (Fig. 5). Verificou-se bandas de hibridização para as linhagens *X. campestris* pv vesicatoria 317 e 479, e nos plasmídios KS41, pVE41 e pVE42 com a revelação de uma banda mais intensa de 4 kb em todas as amostras. (Fig. 5B).

A hibridização da sonda EE41 com os DNAs cromossômicos indicaram que EE41 é realmente originário do genoma da linhagem *X. campestris* pv vesicatoria 317 e que existe uma região homóloga na linhagem *X. campestris* pv vesicatoria 479.

Tabela 4. Porcentagem de plântulas que apresentaram sintomas de doença após inoculação com as linhagens *X. campestris* pv *manihotis* 289, *X. campestris* pv *vesicatoria* 317, o mutante 7 e os mutantes complementados 7/pVE41, 7/pVE42, 7/pVE43, 7/pVE44 nos testes de patogenicidade em sementes, hipocótilos e plântulas

linhagens	semente		hipocótilo		plântula	
	-	+	-	+	-	+
289	100	0	98	2	59,8	40,2
317	3,6	96,4	4	96	0	100
mutante 7	82,1	17,9	26	74	71,4	28,6
7/pVE41	3,6	96,4	8	92	5,4	94,6
7/pVE42	0	100	32	68	58,9	41,1
7/pVE43	0	100	50	50	0,9	99,1
7/pVE44	3,6	96,4	22	78	10,7	89,3

=28 sementes no teste em sementes

=50 hipocótilos no teste em hipocótilos

=112 sementes no teste em plântulas

-=plântula ou hipocótilo sem sintoma

+ =plântula ou hipocótilo com sintoma

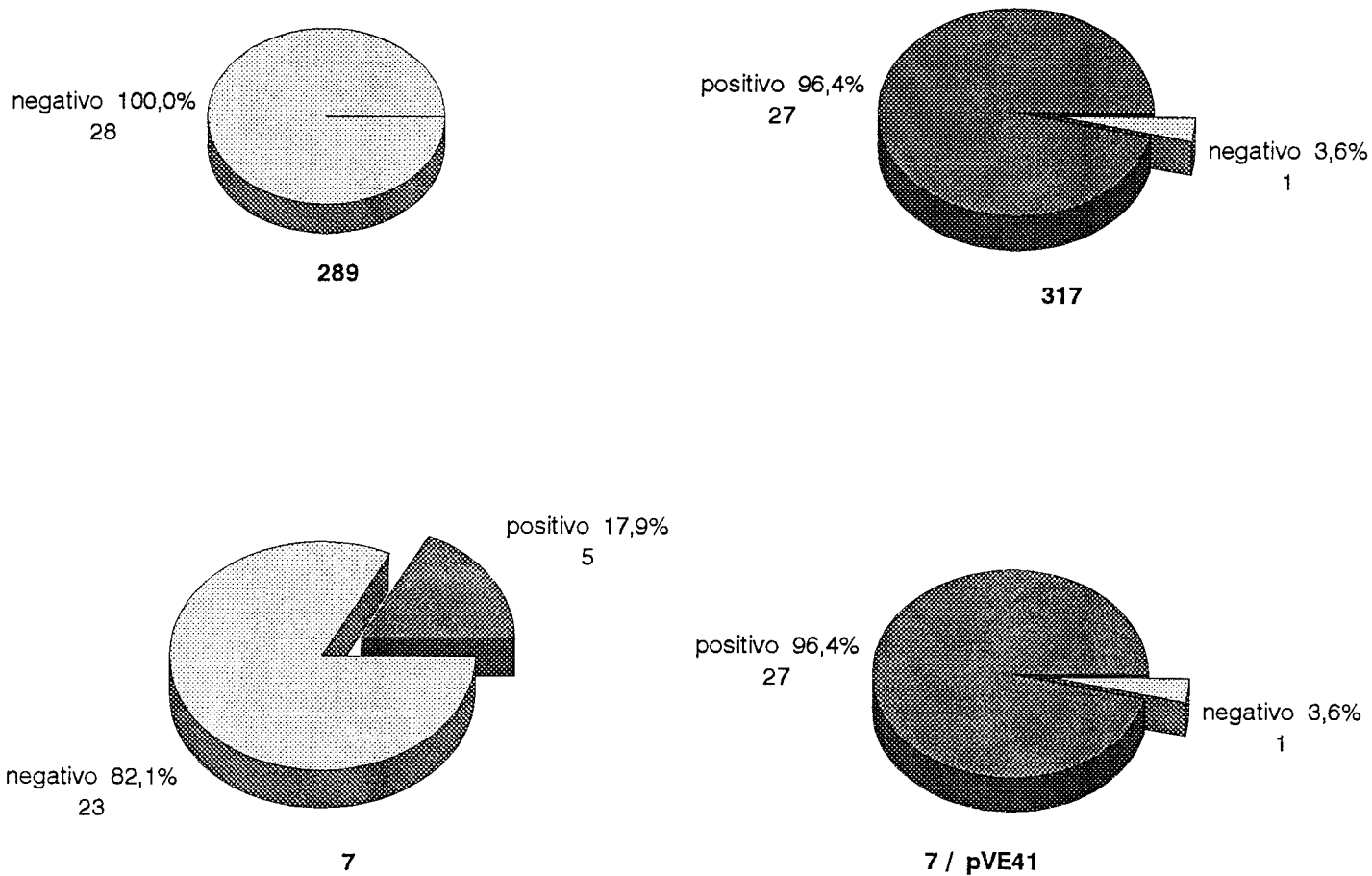


Figura 2. Porcentagem de plântulas que desenvolveram sintomas de doenças no teste de patogenicidade em sementes de tomate com as linhagens *X. campestris* pv vesicatoria 317, *X. campestris* pv manihotis 289, mutante 7 e o muntante complementado 7/pVE41

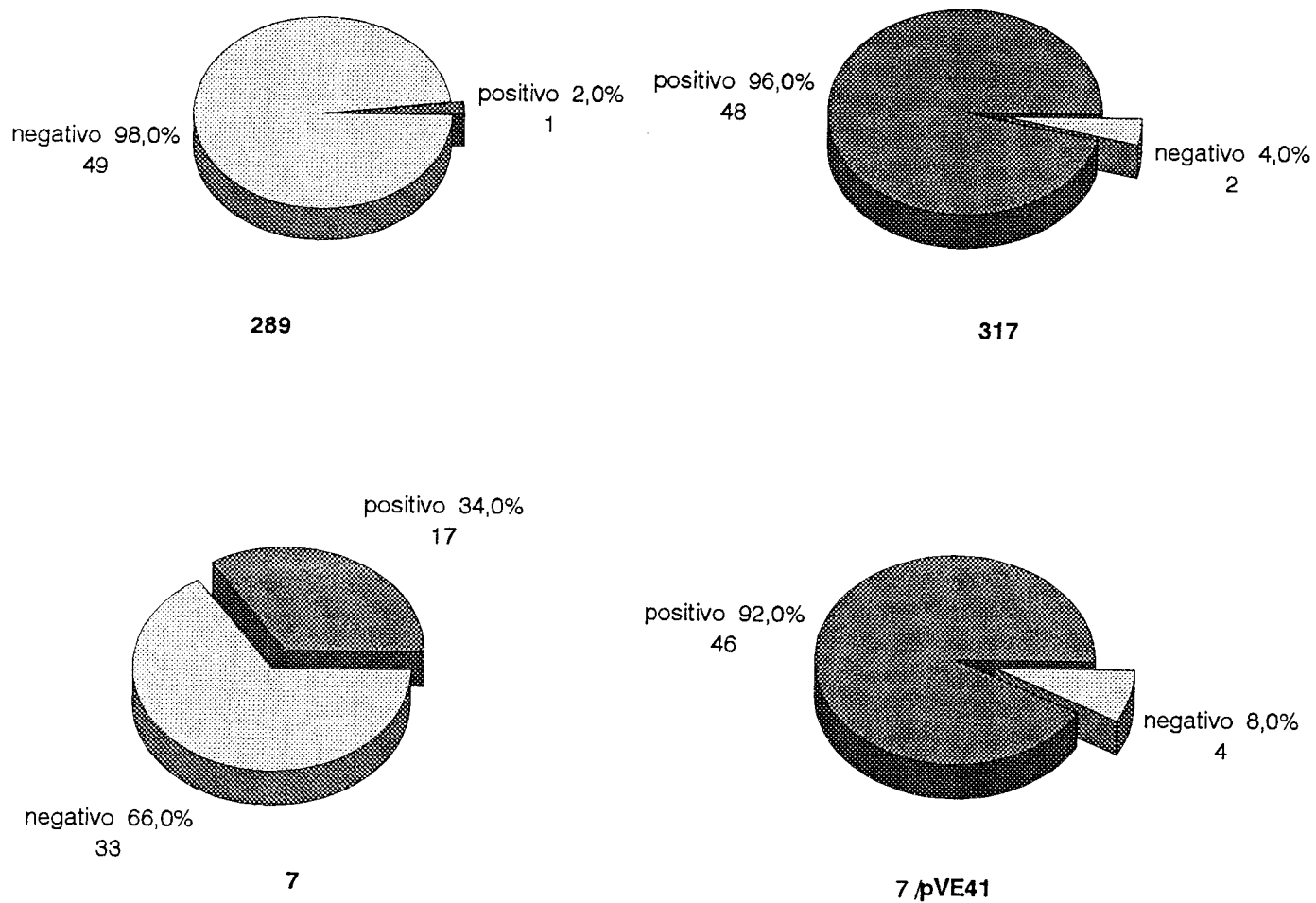


Figura. 3. Porcentagem de hipocótilos que desenvolveram sintomas de doença no teste de patogenicidade em tomate com as linhagens *X. campestris* pv *vesicatoria* 317, *X. campestris* pv *manihotis* 289, mutante 7 e o muntante complementado 7/pVE41

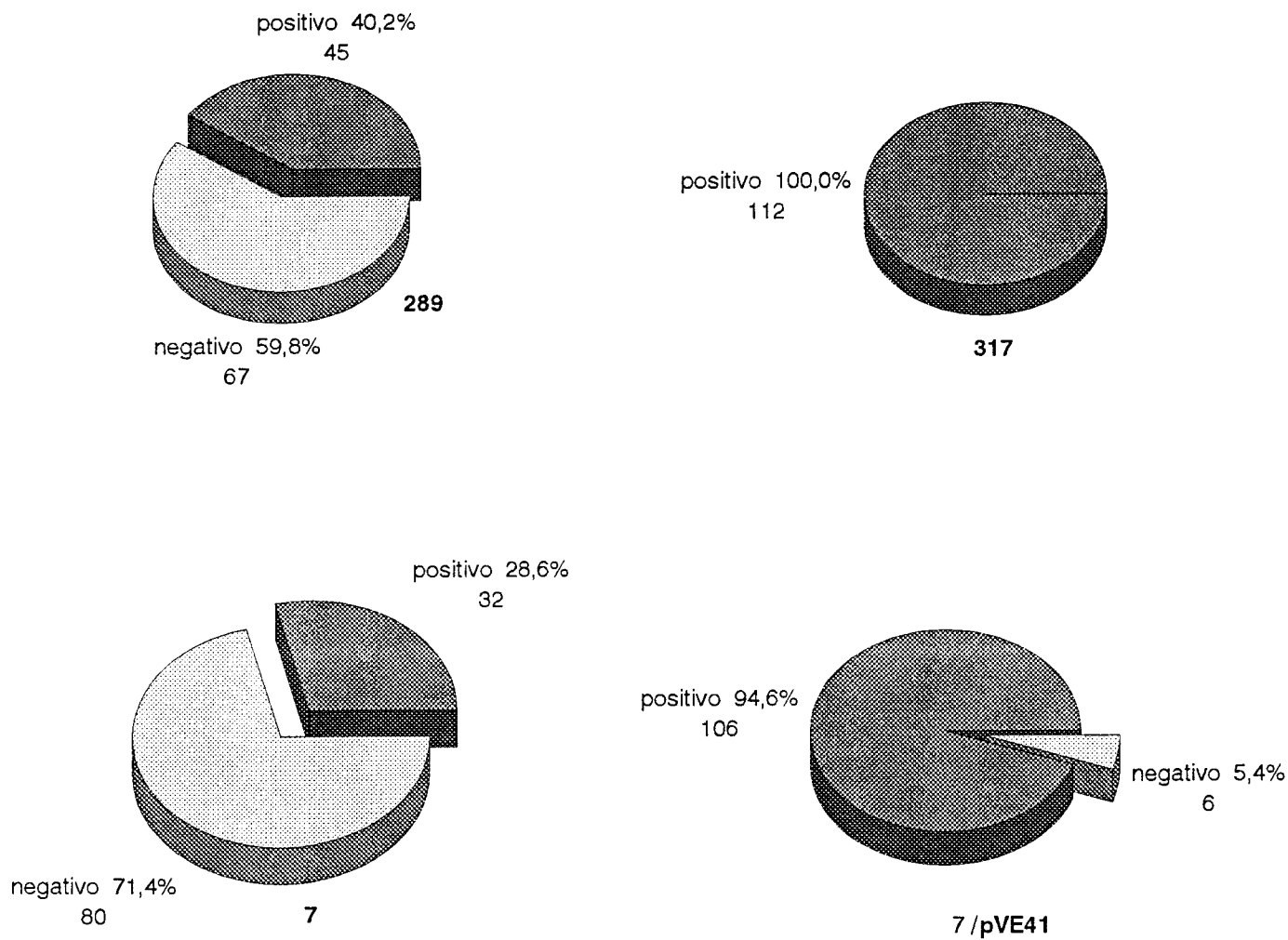


Figura. 4. Porcentagem de plântulas que desenvolveram sintomas de doença no teste de patogenicidade em plântulas de tomate com as linhagens *X. campestris* pv vesicatoria 317, *X. campestris* pv manihotis 289, mutante 7 e o mutante complementado 7/pVE41

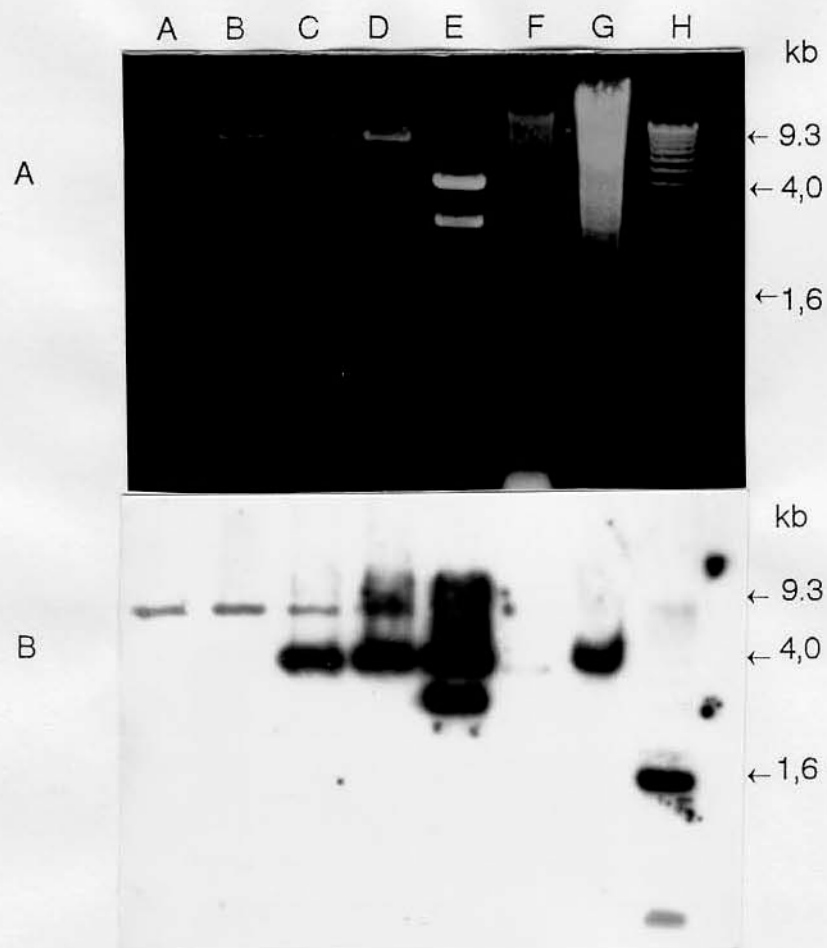


Figura 5. A) Eletroforese em gel de agarose 0,8% DNA genômico e plasmidial digeridos com *EcoRI*. B) Hibridização do mesmo gel com a sonda EE41. a) pVE44, b) pVE43, c) pVE42, d) pVE41, e) KS41, f) DNA genômico da linhagem de *X. campestris* pv. vesicatoria 317, g) DNA genômico da linhagem de *X. campestris* pv. vesicatoria 479 e h) ladder 1 kb (BRL). As bandas de 9.3 kb, 2.9 kb, 1.6 kb e 0.5 kb são resultantes de hibridização inespecífica da sonda EE41 com os vetores pUFR027 e o pBluescript KS+ e o ladder.

A hibridização da sonda EE41 com o plasmídeo pVE42 com mesma intensidade e mesmo peso molecular que o plasmídeo pVE41 indica homologia destes dois insertos (Figs 5A e 5B). Apesar da similaridade dos dois insertos, testes de patogenicidade indicaram diferenças entre eles.

Não houve hibridização com os insertos dos plasmídios pVE43 e pVE44, de onde se conclui que estes não possuem homologia com o inserto do plasmídeo pVE41, podendo se tratar de sequências diferentes que, de alguma maneira, afetam também a patogenicidade como foi verificado nos testes de patogenicidade.

#### 4.1.4. Perfil de proteínas totais

Os quatro mutantes complementados 7/pVE41, 7/pVE42, 7/pVE43 e 7/pVE44, foram analisados quanto ao perfil de proteínas totais com a finalidade de se detectar outras diferenças entre eles além da patogenicidade.

Proteínas totais extraídas das linhagens *X. campestris* pv. vesicatoria 317, 479, do mutante 7, e dos mutantes complementados 7/pUFR027, 7/pVE41, 7/pVE42, 7/pVE43 e 7/pVE44 foram analisadas através de geis de eletroforese (SDS-PAGE) (Fig. 6- gel 1 e 2).

Verificou-se diferenças no perfil de proteínas totais nos mutantes complementados na região entre 29 kDa e 45 kDa. Algumas bandas foram observadas em apenas um mutante, como por exemplo, uma banda de 40 kDa (banda c) presente no mutante 7/pVE41 e uma banda de 41 kDa (banda d) presente no mutante 7/pVE43. Uma banda de 43 kDa (banda e) foi observada somente no mutante 7/pVE44 e nas linhagens originais (317 e 479) (Fig. 6-gel 1).

As linhagens de *X. campestris* pv. vesicatoria 317 e 479 apresentaram uma banda de 32 kDa (banda a), que é caracterizada pela alta afinidade por prata, sendo a primeira a ser visualizada durante o processo de coloração (Stall *et al.*, 1994).

A banda de 32 kDa, juntamente com uma de 27 kDa, foram utilizadas por alguns autores (Jones *et al.*, 1993; Stall *et al.*, 1994, Vauterin *et al.*, 1995), para dividir o patovar

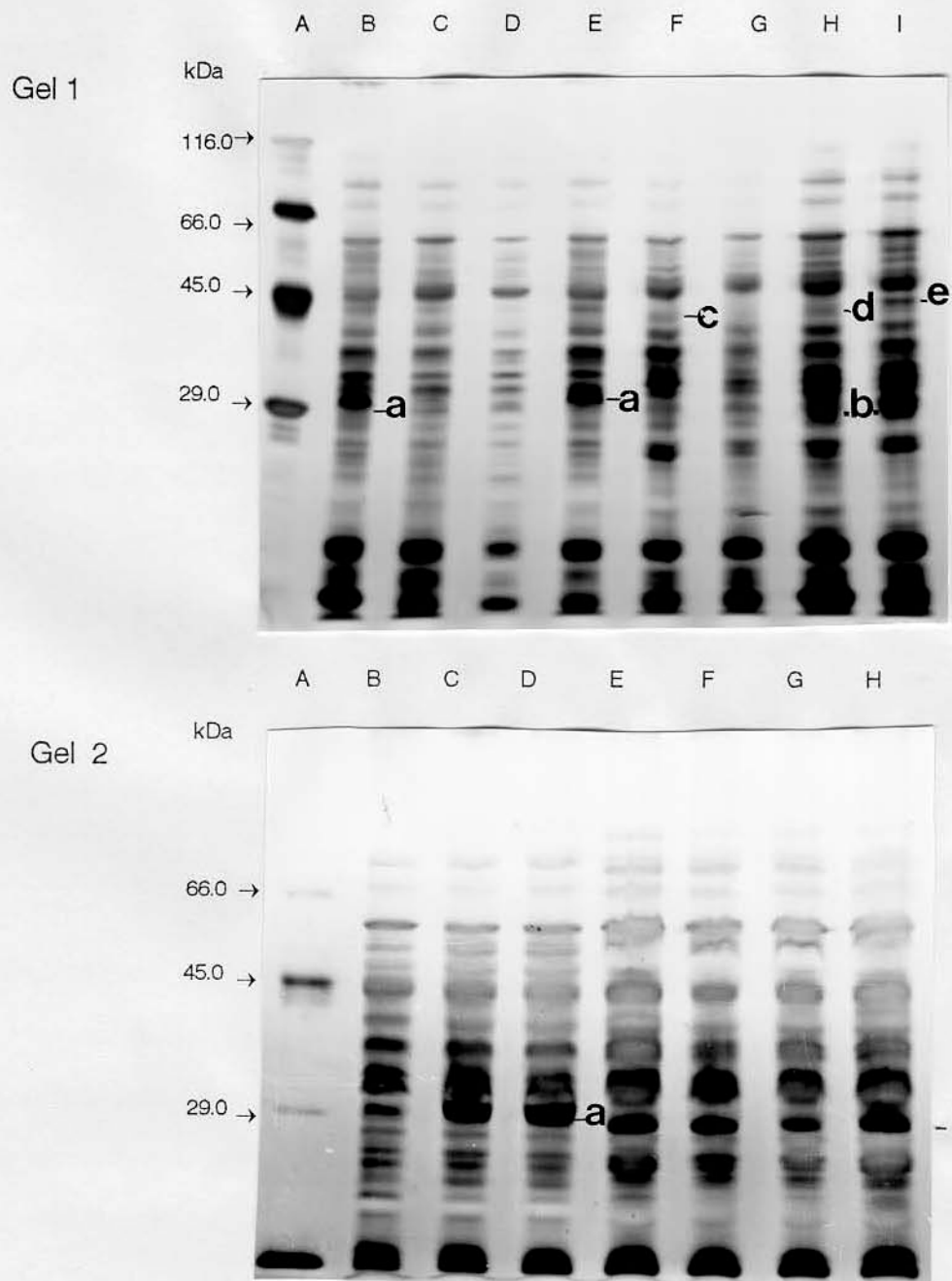


Figura 6. Eletroforese de proteínas totais de linhagens de *X. campestris pv vesicatoria*. Gel 1: A) Marcador de peso molecular, B) *X. campestris pv vesicatoria* 479, C) mutante 7, D) 7/pUFR027, E) *X. campestris pv vesicatoria* 317, F) 7/pVE41, G) 7/pVE42, H) 7/pVE43, I) 7/pVE44. Gel 2: A) Marcador de peso molecular, B) *X. campestris pv vesicatoria* 479, C) *X. campestris pv vesicatoria* 317, D) mutante 7, E) 7/pVE41, E) 7/pVE42, G) 7/pVE43, H) 7/pVE44. As letras minúsculas indicam as bandas no gel. a) banda de 32 kDa, b) banda de 27 kDa, c) banda de 40 kDa, d) banda de 41 kDa, e) banda de 43 kDa.



vesicatoria. A divisão em dois subgrupos, A e B, foi efetuada considerando-se, além de outras características fenotípicas, a presença das bandas  $\alpha$  (32 kDa-banda a) e  $\beta$  (27 kDa-banda b). Esta divisão também está relacionada com o hospedeiro que a bactéria infecta, onde as bactérias com a banda  $\alpha$  infectam o pimentão e as bactérias com a banda  $\beta$  infectam o tomate.

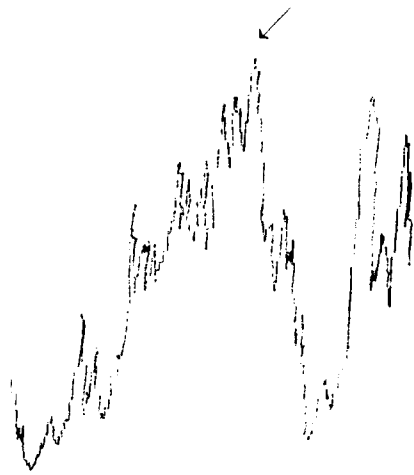
Uma análise densitométrica foi efetuada com o gel 1 através do programa Gel Maneger, onde verificou-se que a banda  $\alpha$  (a) está em menor quantidade no mutante 7 do que nas linhagens selvagens 479 e 317 (Fig 7).

Os mutantes complementados 7/pVE43 e 7/pVE44 possuem uma banda de aproximadamente 27 kDa, a segunda a aparecer no gel, que aparentemente não está presente nas linhagens selvagens e no mutante. Nos mutantes complementados 7/pVE41 e 7/pVE42, a banda de aproximadamente 27 kDa, foi observada somente no gel 2 (Fig. 6), podendo indicar que a proteína de ~27 kDa parece ser facilmente degradada.

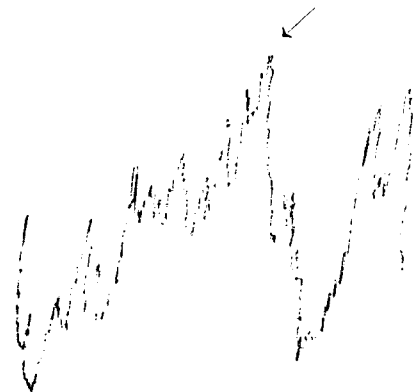
#### **4.1.5. Produção de enzimas extracelulares**

Este experimento foi realizado com o objetivo de verificar se o mutante 7 e os mutantes complementados 7/pVE41, 7/pVE42, 7/pVE43 e 7/pVE44 apresentam alteração na produção de enzimas extracelulares. Todas as linhagens testadas apresentaram atividade celulolítica, amilolítica e proteolítica com exceção da linhagem *X. campestris* pv. vesicatoria 479 que não apresentou atividade proteolítica (Tab. 5).

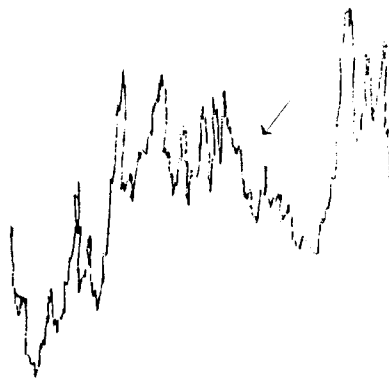
A linhagem *X. campestris* pv. vesicatoria 317, o mutante 7, e os mutantes complementados 7/pVE41 e 7/pVE43 apresentaram atividade pectinolítica e o restante das linhagens testadas não apresentaram atividade desta enzima. Como observado, o mutante 7 não apresentou deficiência na produção de nenhuma das enzimas extracelulares estudadas (Tab.5).



*X. campestris* pv vesicatoria 317



*X. campestris* pv. vesicatoria 479



mutante 7

Figura 7. Densitometria das linhagens *X. Campestris* pv. vesicatoria isolados 317 e 479 e do mutante 7. As setas indicam o pico correspondente a proteína de 32 kDa.

Tabela 5. Produção das enzimas extracelulares amilase, celulase, pectinase e protease, produzidas por *X. campestris* pv. vesicatoria 317, 479, mutante 7 e os mutantes complementados 7/pVE41, 7/pVE42, 7/pVE43, 7/pVE44. A linhagem *X. campestris* pv. vesicatoria 317 foi utilizada como controle positivo.

linhagens	Atividade Amilolítica	Atividade Celulolítica	Atividade Pectinolítica	Atividade Proteolítica
479	+	+	-	-
317	+	+	+	+
mutante 7	+	+	+	+
7/pVE41	+	+	+	+
7/pVE42	+	+	-	+
7/pVE43	+	+	+	+
7/pVE44	+	+	-	+

## 4.2. CARACTERIZAÇÃO DO CLONE VE41

Uma vez que o mutante complementado 7/pVE41 foi o mais virulento nos testes de patogenicidade realizados em tomate, este foi submetido à uma caracterização mais detalhada quanto à patogenicidade, reação de hipersensibilidade em tabaco, efeito e homologia em outros patovares, produção de EPS.

### 4.2.1. Testes de patogenicidade, crescimento “in planta”

O mutante complementado 7/pVE41 foi submetido novamente aos diferentes testes de patogenicidade utilizando-se um número maior de plântulas ou sementes procurando-se determinar a curva de crescimento na planta. Como controle foram utilizadas as linhagens *X. campestris* pv. *vesicatoria* 317 (positivo), *X. campestris* pv. *manihotis* 289 e o mutante 7 como controles negativos.

No teste de patogenicidade em folhas de pimentão, observou-se, que o mutante complementado 7/pVE41 apresentou sintoma semelhantes ao da linhagem de *X. campestris* pv *vesicatoria* 317, provocando necrose úmida que se espalhou além do ponto de inoculação. Nos controles negativos (mutante 7 e *X. campestris* pv *manihotis* 289) observou-se apenas uma clorose que não progrediu (Fig. 8).

No teste em sementes verificou-se que o mutante 7 desenvolveu sintomas de doença em apenas 2% das plântulas inoculadas, enquanto que o mutante complementado 7/pVE41 desenvolveu sintomas de doença em 67% das plântulas inoculadas. A linhagem *X. campestris* pv *manihotis* 289 não desenvolveu sintomas de doença nas plântulas inoculadas, enquanto que a linhagem *X. campestris* pv *vesicatoria* 317 desenvolveu sintomas de doença em 83,7% das plântulas.

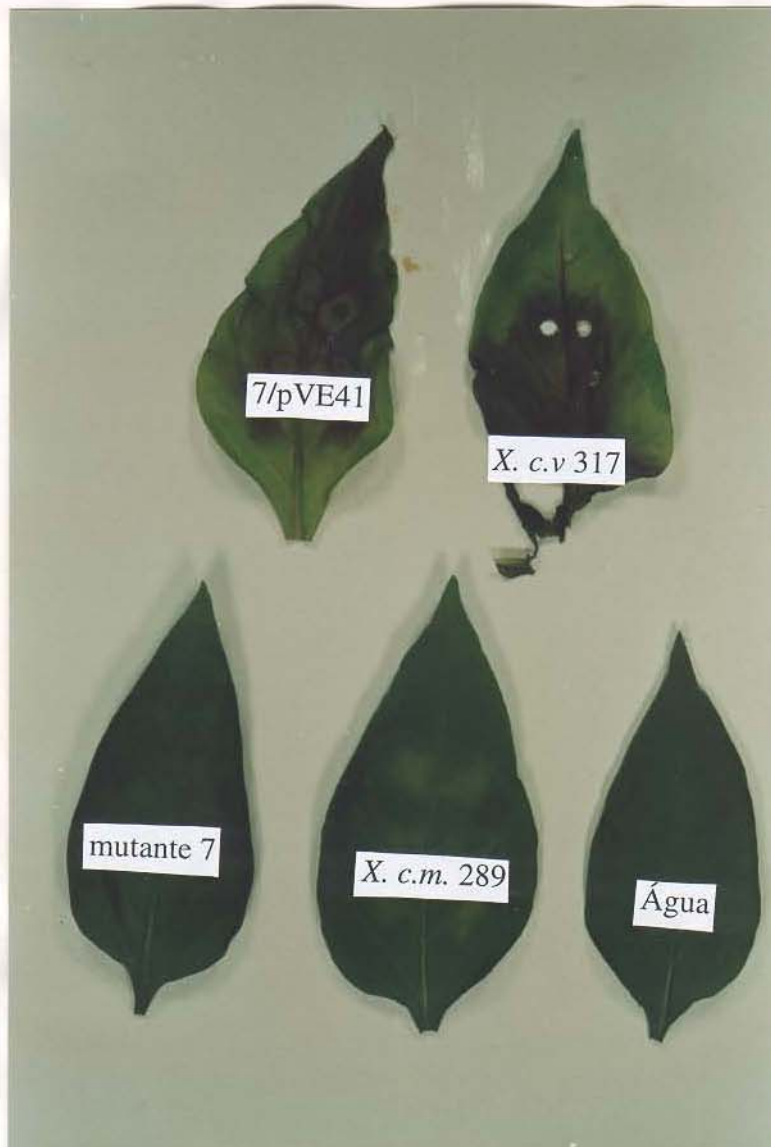


Figura 8. Teste de patogenicidade em folhas de pimentão com as linhagens *X. campestris* pv vesicatoria 317, *X. campestris* pv manihotis 289, o mutante 7 e o mutante complementado 7/pVE41.

Quando se determinou o número de unidades formadoras de colônias (UFC) nos testes em sementes, em hipocótilo e em folhas, verificou-se que o número de células bacterianas aumentou no decorrer do tempo em que foram analisados (4 dias) mesmo naquelas onde não se verificou o desenvolvimento de sintomas de doença (Figs. 9, 10 e 11). O número de células bacterianas nestes três testes foi extremamente alto, provavelmente causado por algum erro na metodologia. Considerou-se entretanto, que esse erro foi o mesmo para todas as amostras, e que portanto, os resultados do crescimento bacteriano no tecido da planta poderiam ser comparados. Observou-se assim, que no teste em plântula, o mutante complementado 7/pVE41 apresentou uma taxa de crescimento semelhante ao da linhagem selvagem *X. campestris* pv. vesicatoria 317 diferindo significativamente da taxa de crescimento de *X. campestris* pv. manihotis 289 utilizada como controle negativo (Fig. 9).

No teste em hipocótilo, o crescimento bacteriano medido foi semelhante para todas as linhagens testadas, superior a  $10^9$  cel./hipocótilo (Fig. 10). Neste teste, o mutante 7 e a linhagem *X. campestris* pv. manihotis 289 apresetaram valores muito próximos do mutante complementado 7/pVE41 com creca de  $10^{10}$  cel./hipocótilo no quinto dia. Este resultado pode ser explicado pelo fato do teste em hipocótilo, desenvolvido em nosso laboratório (Marques & Rosato., 1995), ser um teste muito drástico, provocando lesões que tornam os tecidos muito mais suscetível ao desenvolvimento da bactéria.

No teste em folhas, verificou-se que o crescimento bacteriano do mutante complementado 7/pVE41 foi semelhante ao da linhagem *X. campestris* pv. vesicatoria 317 no quarto dia, diferindo significativamente do mutante 7 e da linhagem *X. campestris*

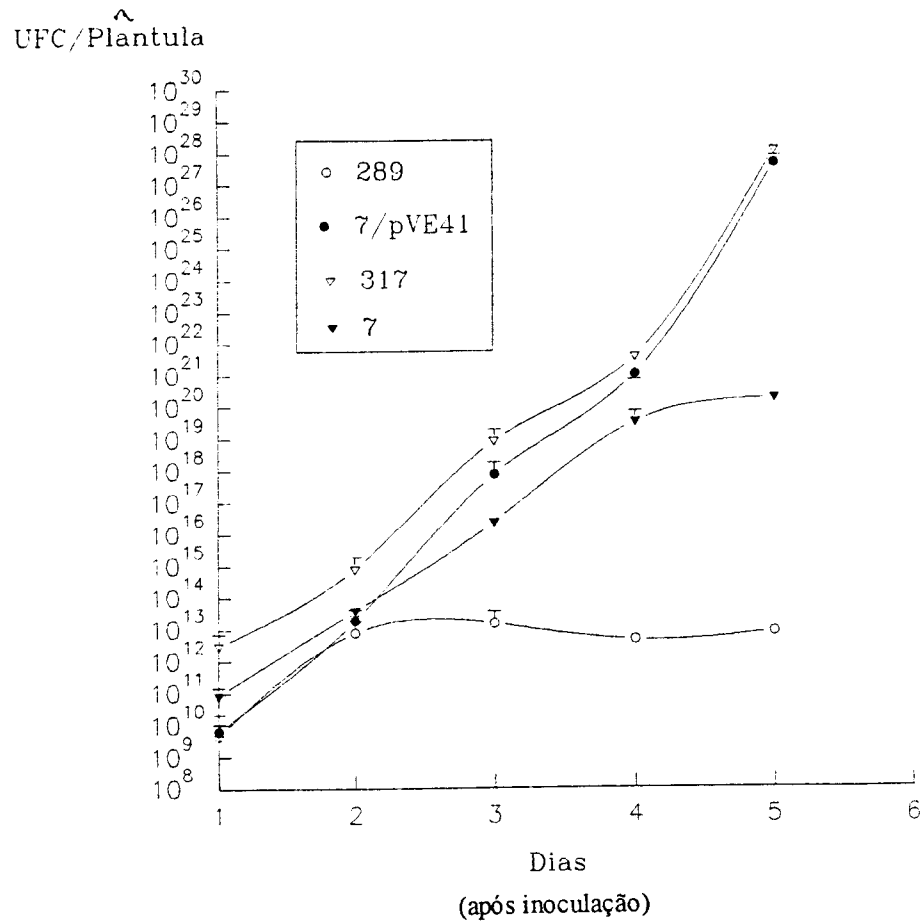


Figura 9. UFC (unidades formadoras de colônias)/plântula das linhagens *X. campestris* pv vesicatoria 317, *X. campestris* pv manihotis 289, o mutante 7 e o mutante complementado 7/pVE41 inoculadas em sementes. Os pontos são a média de 3 repetições +/- o desvio padrão.

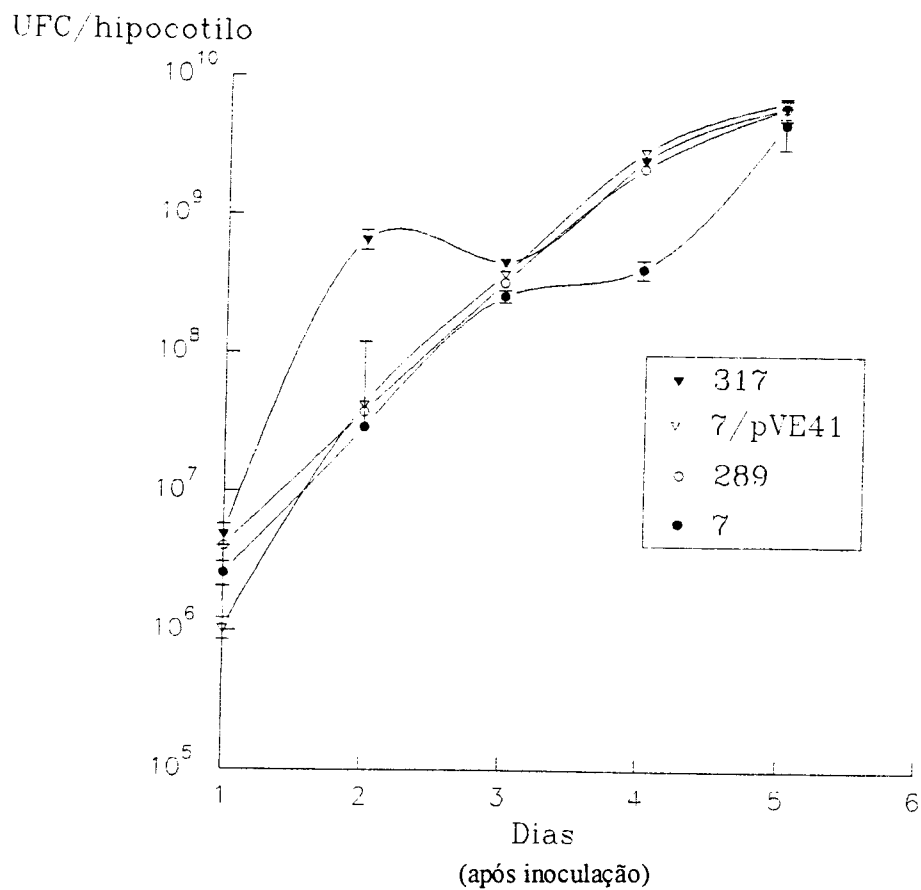


Figura 10. UFC (unidades formadoras de colônias)/ hipocótulo das linhagens *X. campestris* pv vesicatoria 317, *X. campestris* pv manihotis 289, o mutante 7 e o mutante complementado 7/pVE41, inoculadas em hipocótulo. Os pontos são a média de 3 repetições +/- o desvio padrão.



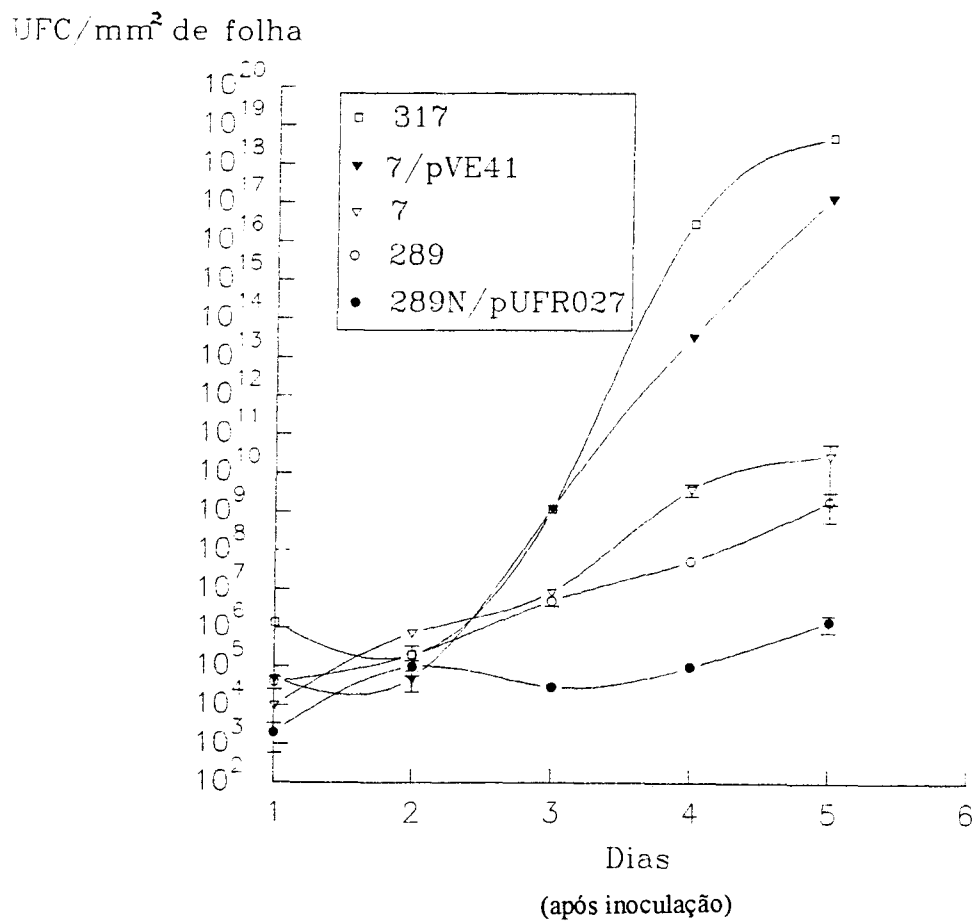


Figura 11. UFC (unidades formadoras de colônias)/mm<sup>2</sup> de folhas, das linhagens *X. campestris* pv vesicatoria 317, *X. campestris* pv manihotis 289, o mutante 7 e o mutante complementado 7/pVE41, inoculadas em folhas. Os pontos são a média de 3 repetições +/- o desvio padrão.

pv. manihotis 289 (Fig. 11).

#### **4.2.2. Teste de hipersensibilidade**

No teste com folhas de tabaco, verificou-se 24 hs após a inoculação, o desenvolvimento de clorose seca e restrita ao local de inoculação, característico de reação de hipersensibilidade tanto no mutante complementado 7/pVE41 quanto no mutante 7 e nas linhagens de *X. campestris* pv. vesicatoria 317 e *X. campestris* pv. manihotis 289 (Fig. 12).

#### **4.2.3. Transferência do pVE41 para outras linhagens receptoras**

As linhagens *X. campestris* pv. glycines 333; *X. campestris* pv manihotis 289; *X. campestris* pv citri 223 e *X. campestris* pv. phaseoli 558 foram eletrotransformadas com os plasmídios pUFR027 e pVE41. Essas linhagens têm como hospedeiros compatíveis, a soja, mandioca, laranja e feijão, respectivamente, não desenvolvendo portanto sintomas de doença em tomate e/ou pimentão. As novas linhagens transformadas foram submetidas aos testes de patogenicidade em tomate. Este teste foi feito para verificar se as linhagens transformadas passariam a reconhecer o tomate como planta hospedeira, o que poderia indicar a presença de genes do tipo *hsv* no inserto EE41.

-Teste em sementes de tomate

No teste em sementes, verificou-se que as linhagens *X. campestris* pv vesicatoria 317 e o mutante complementado 7/pVE41 apresentaram 40,8% e 34,7% de plântulas com sintomas de doença, respectivamente (Tab. 6).

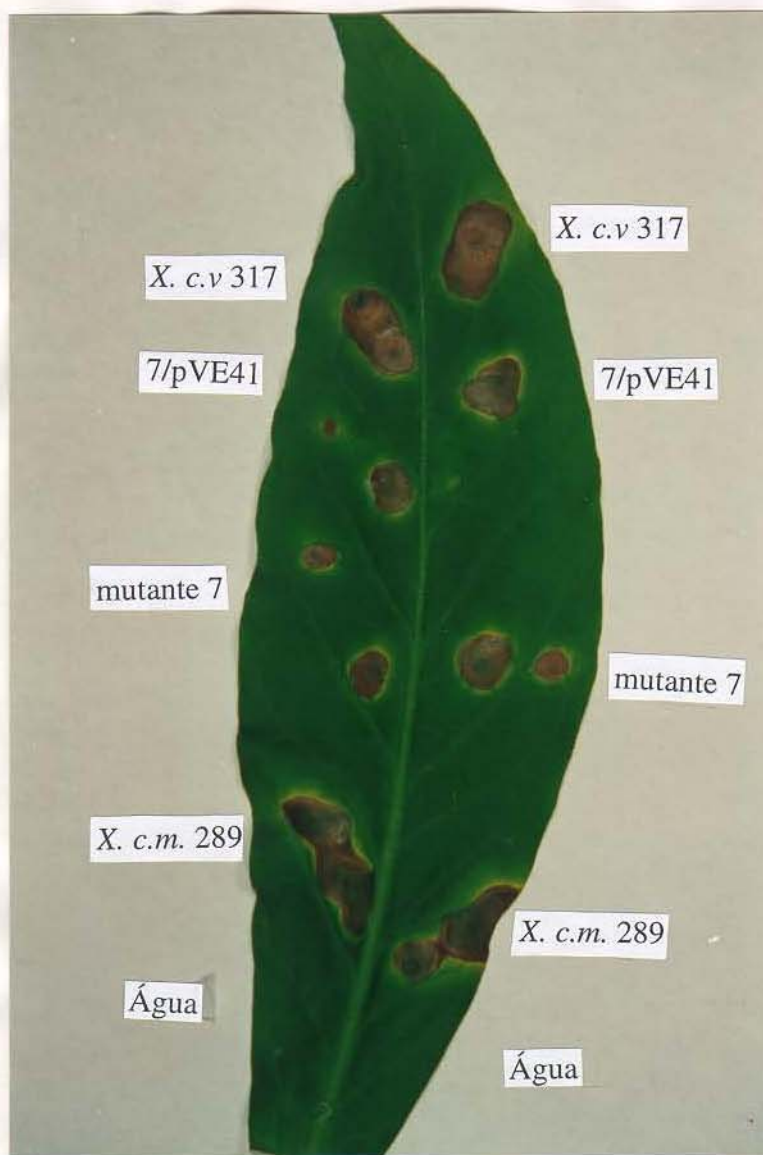


Figura 12. Teste de hipersensibilidade em folha de tabaco com as linhagens *X. campestris* pv vesicatoria 317, *X. campestris* pv manihotis 289, o mutante 7 e o mutante complementado 7/pVE41

Tabela 6. Porcentagem de plântulas afetadas no teste em sementes com as linhagens de *X. campestris* pv. vesicatoria 317, *X. campestris* pv manihotis 289, *X. campestris* pv glycines 333, *X. campestris* pv citri 223, *X. campestris* pv phaseoli 558, os transformantes 7/pUFR027, 289/pUFR027, 289/pVE41, 333/pUFR027, 333/pVE41, 223/pUFR027, 223/pVE41, 558/pUFR027, 558/pVE41, o mutante 7 e o mutante complementado 7/pVE41.

linhagem	com sintomas (%)	linhagem	com sintomas (%)
317	40,8	289N	6,1
7	6,1	289N/pUFR027	16,3
7/pUFR027	16,3	289N/pVE41	16,3
7/pVE41	34,7	558	14,3
333	0	558/pUFR027	16,3
333/pUFR027	0	558/pVE41	14,3
333/pVE41	0	223	4,1
		223/pUFR027	nd
		223/pVE41	0

Foram tratadas 49 sementes/linhagem.

A avaliação foi efetuada até o sexto dia após a inoculação.

nd= não determinado

As linhagens de *X. campestris* pv. manihotis 289, *X. campestris* pv phaseoli 558, *X. campestris* pv glycines 333 e *X. campestris* pv citri 223 que foram eletrotransformadas com o plasmídio pVE41, apresentaram resultados similares ou inferiores aos obtidos para o mutante 7/pUFR027 (16,3%), chegando ao não se observar nenhuma plântula com sintoma de doença como foi o caso da linhagem 333, 333/pUFR027 e 333/pVE41 (Tab. 6).

A linhagem *X. campestris* pv vesicatoria 317 e o mutante 7/pVE41 apresentaram em média, crescimento bacteriano de  $10^{11}$  UFC/plântula e o mutante 7 de  $10^9$  UFC/plântula (Fig 13). Para as outras linhagens, *X. campestris* pv. glycines 333, citri 223, phaseoli 558 e manihotis 289 e as transformadas somente com o vetor pUFR027 ou com o plasmídio pVE41, observou-se valores médios de crescimento bacteriano da ordem de  $10^8$  UFC/plântula (Fig. 14). Esse valores foram significativamente menores que os observados para a linhagem selvagem *X. campestris* pv. vesicatoria 317 e para o mutante complementado 7/pVE41. Os dados sugerem portanto, que pVE41 quando transferido para os patovares glycines, citri, phaseoli e manihotis não é capaz de induzir patogenicidade dessas linhagens em tomate. Isto pode ser confirmado pela análise de sintoma em folhas de tomate e pimentão (abaixo).

#### -Teste em folhas de tomate e pimentão

Em plantas de tomate e pimentão foram inoculados as linhagens 317, 223,223/pVE41, 223/pUFR027, 558, 558/pVE41, 558/pUFR027, 333, 333/pVE41, 333/pUFR027, 289, 289/pVE41, 289/pUFR027, 7/pVE41 e o mutante 7.

UFC/Plântulas

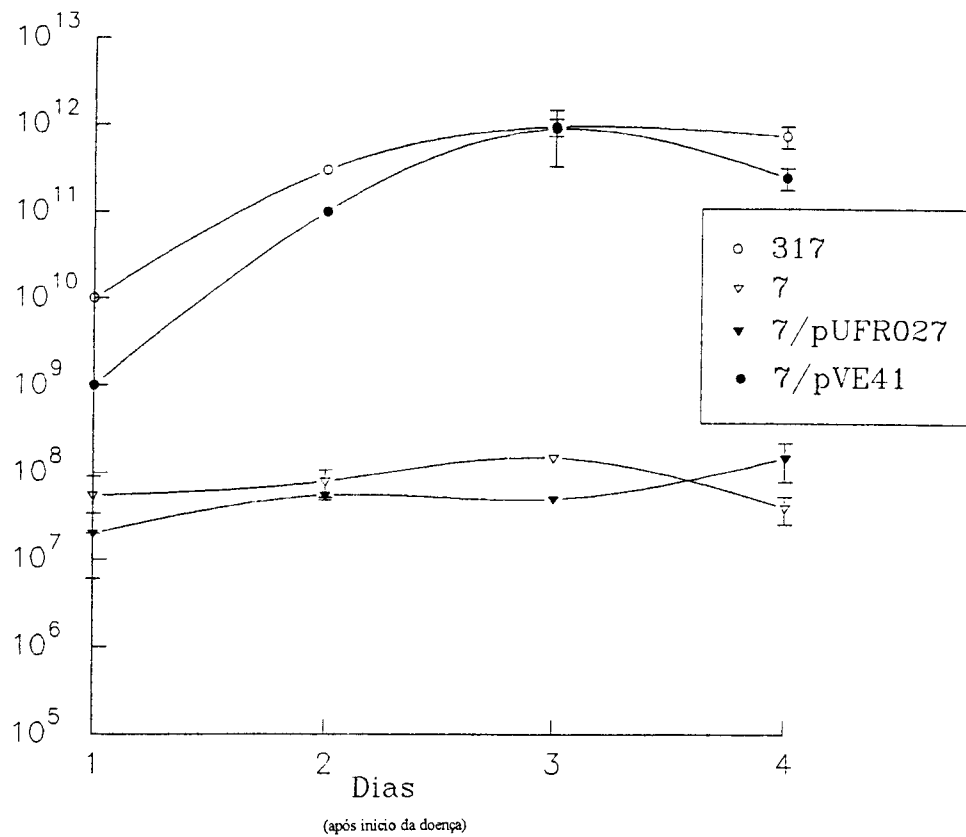


Figura 13. UFC (Unidades formadoras de colônias)/plântulas das linhagens de *X. campestris* pv. *vesicatoria* 317, o mutante 7, 7/pVE41 e *X. campestris* pv. *manihotis* 289 no teste em sementes. Os pontos são a média de 3 repetições +/- o desvio padrão.

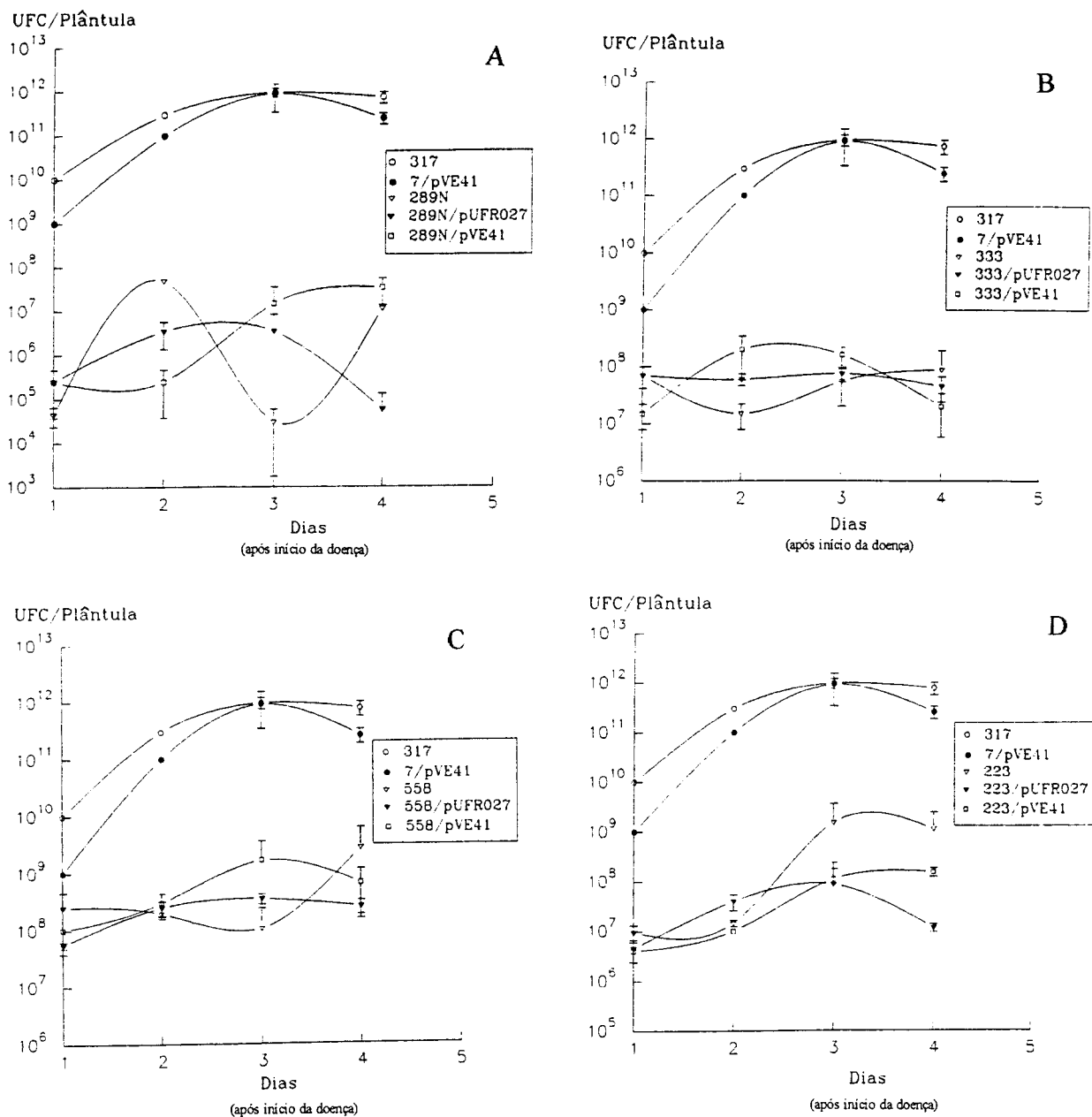


Figura 14. UFC (Unidades formadoras de colônias)/plântulas A) linhagens de *X. campestris* pv. vesicatoria 317, o mutante 7, 7/pVE41, *X. campestris* pv manihotis 289, 289/pUFR027 e 289/pVE41, B) *X. campestris* pv glycines 333, 333/pUFR027 e 333/pVE41, C) *X. campestris* pv phaseoli 558, 558/pUFR027 e 558/pVE41, D) *X. campestris* pv citri 223, 223/pUFR027 e 223/pVE41 inoculadas em sementes. Os pontos são a média de 3 repetições +/- o desvio padrão.

Somente a linhagem 317 e o mutane complementado 7/pVE41 desenvolveram sintomas da doença. As linhagens selvagens 223, 558, 333 e 289 e estas mesmas eletrotransformadas com o vetor pUFR027 ou o pVE41, apresentaram resultados semelhantes em tomate, ou seja, um início de necrose no ponto de inoculação progredindo para uma clorose além do ponto de inoculação. Em pimentão, não foi observada nenhuma alteração nas folhas inoculadas (Tab.7).

**-Teste em folha de feijão e soja**

Em plantas de feijão e soja foram inoculados as linhagens compatíveis, *X. campestris pv phaseoli* 558 e *X. campestris pv glycines* 333, respectivamente, bem como, as linhagens com o vetor pUFR027 e o plasmídeo pVE41 e as linhagens 317, 7/pVE41, 7/pUFR027 e o mutante 7.

No teste em folhas de feijão, as linhagens 558, 558/pUFR027 e 558/pVE41 apresentaram desenvolvimento de sintomas da doença, não sendo verificado qualquer alteração quanto a virulência da linhagem selvagem 558 em comparação com 558/pVE41 (Tab. 7). As linhagens 317 e 7/pVE41 induziram o desenvolvimento de “spots” no local de inoculação após o sexto dia mas que não se alastrou.

No teste em folhas de soja observou-se resultado positivo para a linhagem selvagem 333, 333/pUFR027 e para 333/pVE41 no terceiro dia após a inoculação. Para as linhagens 317, 7/pVE41, 7/pUFR027 e para o mutante 7 não foi observado nenhuma alteração no ponto de inoculação (Tab. 7).

**-Teste em folha de mandioca**

Em folhas de mandioca foram inoculadas as linhagens compatíveis *X. campestris pv. manihotis* 289, 289/pUFR027, 289/pVE41 e as linhagens incompatíveis *X. campestris pv vesicatoria* 317, 7/pUFR027, 7/pVE41 e o mutante 7.



Tabela 7. Teste de patogenicidade em folhas de diferentes hospedeiras inoculadas com *X. campestris* pv. *vesicatoria* 317, *manihotis* 289, *citri* 223, *glycines* 333, *phaseoli* 558 e com as respectivas linhagens transformantes com o plasmídeo pVE41.

linhagens	plantas				
	tomate	pimentão	feijão	soja	mandioca
317	+	+	-/+	-/+	-
7	-	-	-	-	-
7/pUFR027	-	-	-	-	-
7/pVE41	+	+	-/+	-/+	-
289N	-	-	nd	nd	+
289N/pUFR07	C	-	nd	nd	+
289N/pVE41	C	-	nd	nd	+
333	-	-	nd	+	nd
333/pUFR027	C	-	nd	+	nd
333/pVE41	C	-	nd	+	nd
223	C	-	nd	nd	nd
223/pUFR027	C	-	nd	nd	nd
223/pVE41	C	-	nd	nd	nd
558	C	-	+	nd	nd
558/pUFR027	C	-	+	nd	nd
558/pVE41	C	-	+	nd	nd

C= clorose  
 -= negativo  
 +/- = pontos pretos

+ = positivo  
 nd = não determinado

Após o quarto dia de inoculação observou-se o aparecimento de manchas angulares nas folhas onde foram inoculadas as linhagens patogênicas 289, 289/pVE41 e 289/pUFR027. A mancha angular se caracteriza por uma necrose escura que se alastra acompanhando o sistema vascular da folha deixando a mancha característica. As linhagens 317, 7/pUFR027, 7/pVE41 e o mutante 7 causaram apenas uma clorose seca restrita ao ponto de inoculação, característica de reação incompatível.

#### **4.2.4. Hibridização de DNA total de outras linhagens e patovares com a sonda EE41**

Com a finalidade de se detectar a existência de sequências homólogas a EE41 em outras linhagens e patovares de *X. campestris*, foi efetuada a hibridização do DNA total de diferentes linhagens com o inserto EE41. Foram utilizadas as linhagens de *E. coli* DH5 $\alpha$ , *X. campestris* pv aberrans, *X. campestris* pv. vesicatoria, *X. campestris* pv. citri, *X. campestris* pv. phaseoli, *X. campestris* pv. manihotis *X. campestris* pv. glycines e *X. campestris* pv. campestris, digerido com a enzima de restrição *EcoRI*. Os resultados obtidos mostraram haver regiões homólogas do DNA das bactérias testadas com o fragmento EE41, com exceção das linhagens de *X. campestris* pv. manihotis 289 e de *E. coli*. DH5 $\alpha$  (Fig. 15).

Observa-se na Fig. 14B que todas as linhagens de *X. campestris* pv. vesicatoria (317, 497, 418, 427, 433, 465, 408 e 1010) exceto a 332, patogênicas ao tomate, apresentaram uma banda de 4 kb enquanto que as linhagens patogênicas ao pimentão, apresentaram uma banda de 12.0 kb. Nas duas linhagens de *X. campestris* pv campestris

(Referência e 8460), aberrans 885 e phaseoli 558 foi verificada uma banda de hibridização de 4 kb.

As linhagens *X. campestris* pv.glycines 333, *X. campestris* pv.aberrans 885, *X. campestris* pv phaseoli 558, *X. campestris* pv. vesicatoria 720, 345, 465, e 427 tiveram digestão parcial ou não digeriram como foi o caso da *X. campestris* pv. manihotis 289, o que dificultou a visualização da banda de hibridização e o seu tamanho.

#### **4.2.5. Produção de EPS**

As linhagens *X. campestris* pv. vesicatoria 317, 479, 7/pVE41 e o mutante 7 foram testadas com relação a produção de EPS em comparação com as linhagens *X. campestris* pv. manihotis 289, 289Nal<sup>f</sup> e 289Nal<sup>f</sup>/pUFR027. Este teste foi realizado para verificar a existência de alguma alteração na produção de goma no mutante 7 e no mutante complementado 7/pVE41.

Foi observado que os maiores valores de viscosidade (cps) foram aqueles apresentados pela linhagem *X. campestris* pv. manihotis 289, utilizada como controle positivo. A linhagem 289Nal<sup>f</sup>/pUFR027 foi utilizada como controle para verificar qualquer alteração na produção de EPS induzida pelo vetor sem inserto (Tab. 8).

Após análise estatística (teste de Tukey), verificou-se que o mutante 7 apresentou valores de viscosidade que não diferiram da linhagem original 479. O mutante complementado 7/pVE41, apresentou valores baixos de viscosidade comparando-se com a linhagem 317 que originou o clone VE41, indicando nenhuma correlação entre patogenicidade e produção de goma.

Pode ser notado entretanto, que pVE41 diminuiu a viscosidade da linhagem 289 em 90 %, indicando uma interação mais específica na produção de goma dessa linhagem.



Figura 15. A) Eletroforese em gel de agarose de DNAs total digeridos com *Eco*RI. ladder 1 kb (Gibco BRL)(A), *E. coli* DH5 $\alpha$ (B), *X. campestris* pv manihotis 289(C); *X. campestris* pv phaseoli 558(D); *X. campestris* pv citri 223(E), 999(G); *X. campestris* pv aberrans 885(F); *X. campestris* pv glycines 333(H); *X. campestris* pv. *campestris* 8460(I), Ref(J); *X. campestris* pv.vesicatoria 345(K), 720(L), 483(M), 1010(N), 408(O), 465(P) 433(Q), 427(R), 418(S), 332(T), 479(U), 317(V), sonda EE41(X); ladder 1 kb (Gibco BRL)(Y). B) Hibridização com a sonda EE41.

Tabela 8. Produção de EPS das linhagens *X. campestris* pv. *manihotis* 289, 289Nal<sup>f</sup>, 289Nal<sup>f</sup>/pUFR027, *X. campestris* pv. *vesicatoria* 317, 479, mutante 7 e os mutantes complementados 7/pVE 41, 7/pVE15, 7/pVE20, 7/pVE05. As letras iguais não diferem significativamente ao nível de 5%. Valores de viscosidade em cps.

Linh\rpm	20	50	100
289	257.67 a	593.33 a	1659.20 a
289/pUFR027	207.50 b	476.67 b	1383.30 b
289/pVE41	25.00 efg	76.67 efg	270.80 ef
7/pVE41	45.00 de	146.67 de	508.30 de
289 Nal <sup>f</sup>	10.83 fg	40.00 fg	150.00 fg
317	<b>132.50 c</b>	343.33 c	1104.20 c
479	26.67 efg	86.67 ef	295.80 ef
7	35.00 ef	113.33 ef	383.30 ef

-Média de três repetições.

#### 4.2.6. Mapa de restrição

Digerindo-se o fragmento EE41, com diferentes enzimas de restrição foram detectados sítios de restrição para as enzimas *HindIII*, *BstXI*, *PstI*, *ApaI*, *SaII*, *HincII*, *BamHI*, *AccI*, *BglII*, *HaeIII*, *AvaI*, e *HinfI* (Tab. 9). Não foram detectados sítios de restrição para as enzimas *SmaI*, *XbaI*, *SacI* e *XhoI*.

As enzimas *ApaI* e *SaII* digeriram o inserto na extremidade dificultando a identificação da posição do sítio no fragmento. Digerindo-se o DNA plasmídial do KS41 com as enzimas *KpnI* e *BstXI* obteve-se a constatação de apenas um sítio de restrição para estas enzimas. Com *HindIII* obteve-se um fragmento de 2kb, um de 1.5kb e outro de 0.5 kb.

Tabela 9. Digestão do EE41 com enzimas de restrição

Enzimas de restrição	Número de sítios	Tamanho dos fragmentos
<i>HindIII</i>	2	2 kb, 1.5 kb e ~0.5kb
<i>BstXI</i>	1	3.5 kb e 0.5 kb
<i>PstI</i>	3	1.4 kb, 1.2kb, 0.8 e 0.6 kb
<i>ApaI</i>	1	3.9 kb e ~0.1 kb
<i>SaII</i>	1	3.9 kb e ~0.1 kb
<i>HincI</i>	3	1.4 kb, 1.2kb, 0.8 e 0.6 kb
<i>BamHI</i>	1	3.9 kb e ~0.1 kb
<i>AccI</i>	1	3.5 kb e ~0.5 kb
<i>BglII</i>	+ de 4	não determinado
<i>HaeIII</i>	+ de 4	não determinado
<i>AvaI</i>	+ de 5	não determinado
<i>HinfI</i>	+ de 4	não determinado

### 4.3. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS SUBCLONES DE EE41

#### 4.3.1. Subclonagem do EE41

Com o objetivo de se restringir o fragmento de DNA, contido no inserto EE41, responsável pela patogenicidade em tomate, digeriu-se o plasmídio KS41 com *HindIII* e os fragmentos resultantes foram ligados no plasmídio pBscript KS+ (item 3.9) originando os plasmídios derivados pKSH20, pKSH15 e pKSH05, contendo insertos de 2,0; 1,5 e 05 kb respectivamente.

#### 4.3.2. Transferência dos insertos dos plasmídios pKSH05, pKSH15 e pKSH2 para vetor o pUFR027.

Os plasmídios pKSH05, pKSH15 e pKSH2 contendo respectivamente os fragmentos de 0.5 Kb, 1.5 Kb e 2 Kb, obtidos após digestão do inserto do plasmídio KS41 com a enzima *HindIII*, foram ligados no vetor pUFR027 através de duplas digestões com as enzimas *KpnI* e *EcoRI*. Estes plasmídios foram denominados pVE05, pVE15 e pVE20 respectivamente (Fig. 16).

As linhagens de *E. coli* DH5 $\alpha$ , o mutante 7 de *X. campestris* pv vesicatoria 479 e *X. campestris* pv manihots 289, foram eletrotransformados com os plasmídios pVE05, pVE15 e pVE20 segundo método de White & Gonzales (1991) modificado por Ferreira *et al* (1995). O vetor pUFR027 intacto também foi introduzido para estas duas linhagens como controle negativo para os testes de patogenicidade. A confirmação da transferência foi verificada pela hibridização dos plasmídios digeridos com *EcoRI* e *KpnI* com a sonda EE41 (Fig. 17).

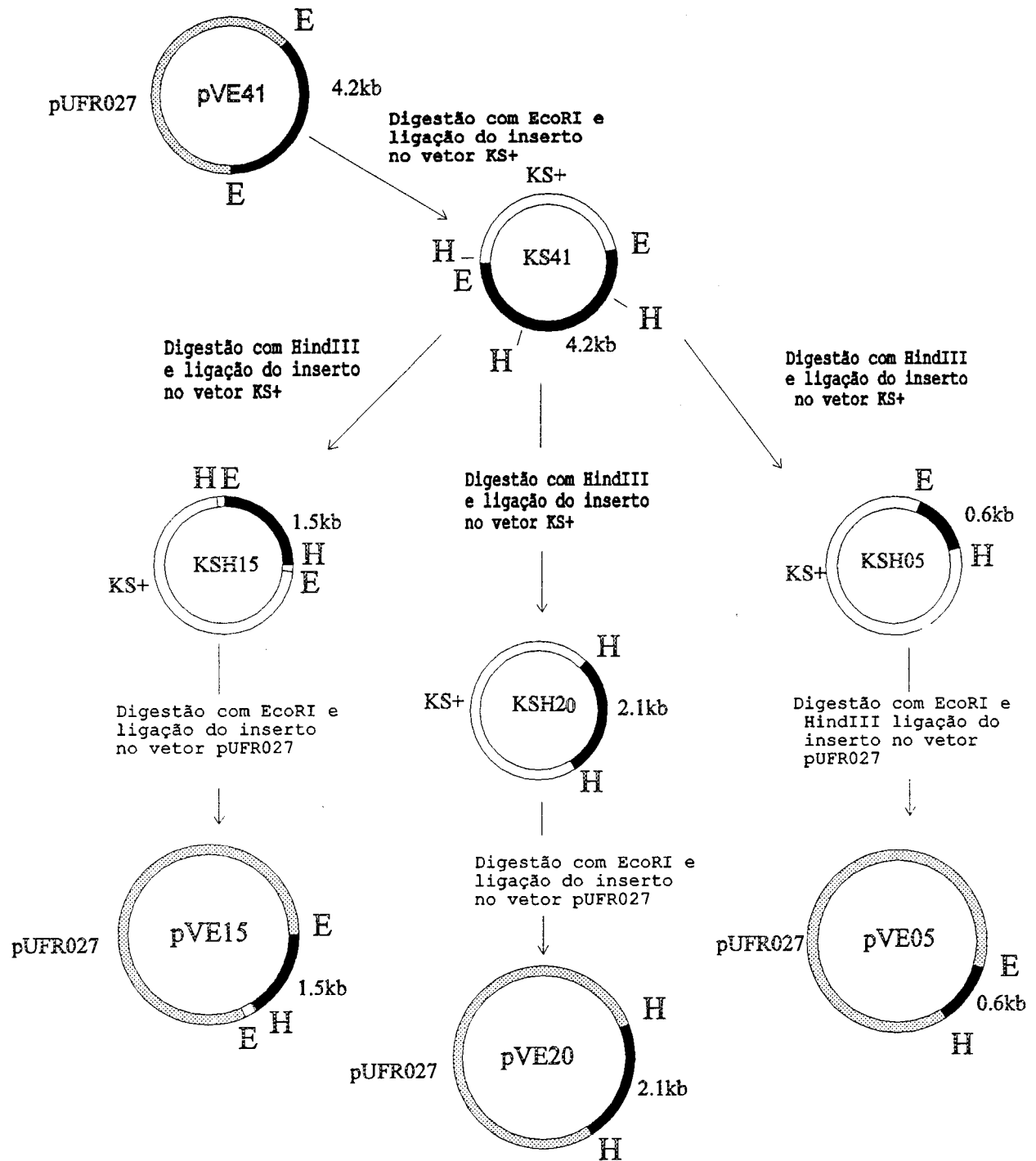


Figura 16. Representação esquemática da subclonagem do pVE41. A região dos plasmídios em branco representa o vetor pBluescript KS+, em cinza: o vetor pUFR027 e em preto: o inserto EE41. E: *EcoRI*; H: *HindIII*. O tamanho dos plasmídios não estão mostrados em escala.



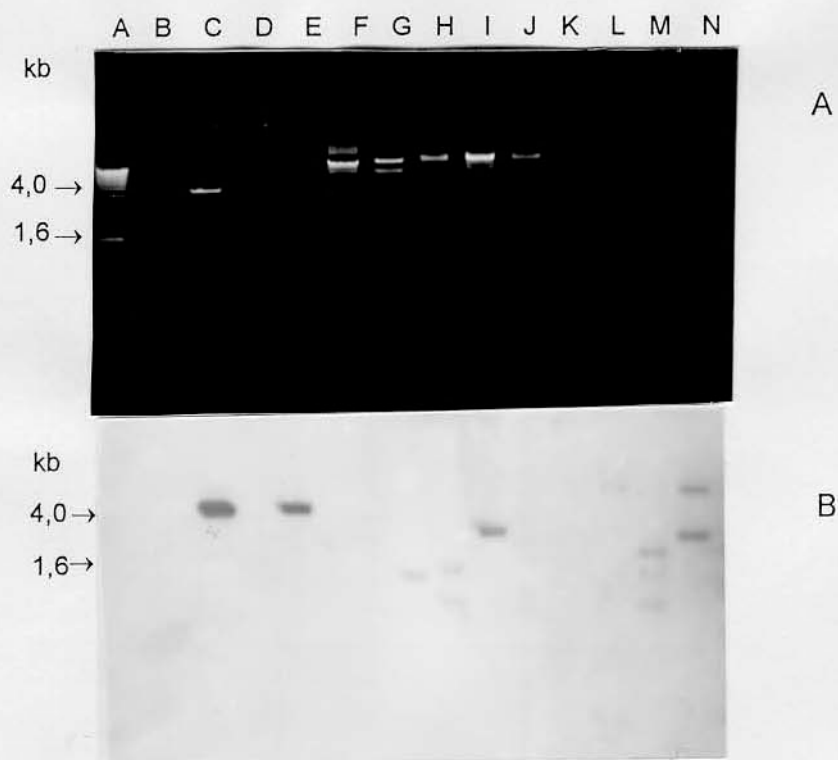


Figura 17. A) Eletroforese em gel de agarose do DNA genômico (g) e plasmidial(p). A: Marcador de 1 kb (BRL, Gibco), B, D, E, F, G, H, J, L, e N foram digeridas com *EcoRI* e as canaletas, I e M foram digeridas com *KpnI* e *EcoRI*. A)pUFR027, C)fragmento EE41, D)317g, E)KS41, F)289, G)289/pUFR027, H)289/pVE15, I)289/pVE05, J)289/pVE20, K)7, L)7/pVE15, M)7/pVE05, N)7/PVE20. B) Hibridização com a sonda EE41.

### 4.3.3. Testes de patogenicidade dos subclones VE05, VE15 e VE20

Nos testes em sementes e folhas, foram utilizadas as linhagens *X. campestris* pv vesicatoria 317, *X. campestris* pv manihotis 289, o mutante 7 e os mutantes complementados 7/pVE41, 7/pVE05, 7/pVE15 e 7/pVE20. Foram também utilizados os derivados da linhagem 289: 289/pVE05, 289/pVE15 e 289/pVE20 com a finalidade de observar o efeito destes subclones em outro patovar.

#### -Teste em sementes

No teste em sementes verificou-se que o mutante complementado 7/pVE41 foi capaz de induzir sintomas de doença em 97.9% das plântulas, sendo superior ao controle positivo 317 (95.9%) (Tab. 10).

O mutante complementados 7/pUFR027 e o transformante 289/pUFR027, utilizadas como controles negativos, produziram sintoma de doença em 24.5% e 22.4% das plântulas, respectivamente. Estes resultados indicaram que a introdução deste vetor nas bactérias acima citadas não alteraram a capacidade destas em induzir ou não sintoma de doença comparando-se com as receptoras 289 (20.4%) e o mutante 7 (14.3%) (Tab. 10).

A capacidade de desenvolver sintomas de doença dos mutantes complementados 7/pVE05 e 7/pVE15 e 7/pVE20 foram consideradas baixas e inferiores ao do mutante complementado original, 7/pVE41 (Tab. 10). Os transformantes 289/pVE05 e 289/pVE15 produziram respectivamente 10.2% e 12.2% de plântulas com sintomas de doença. Observando-se os resultados do transformante 289/pVE20, verificou-se que este não produziu sintomas característicos (necrose das folhas primárias que se apresentaram

escuras e úmidas propagando-se para o caule, levando a murcha da plântula). As plântulas tratadas com este transformante (289/pVE20) apresentaram folhas amareladas, sintoma igualmente observado em alguns testes em sementes com a linhagem *X. campestris* pv manihotis 289.

Verificou-se ainda que o número de plântulas não ultrapassou  $10^8$  UFC, tanto no mutante 7 como na linhagem *X. campestris* pv manihotis 289 com os subclones, contrastando com os resultados do mutante complementado 7/pVE41 ( $10^{13}$  UFC/plântula) e da linhagem selvaem 317 ( $10^{17}$  UFC/plântula) no sexto dia de contagem (Fig. 18A e 18B).

Tabela 10. Porcentagem de plântulas de tomate afetadas no teste em sementes com as linhagens de *X. campestris* pv vesicatoria 317, *X. campestris* pv manihotis 289, 7/pVE41, 7/pVE05, 7/pVE15, 7/pVE20, 289/pVE05, 289/pVE15, 289/pVE20 e o mutante 7

linhagem	doentes (%)	linhagem	doentes (%)
317	95.9	289	20.4
7	14.3	289/pUFR027	22.4
7/pUFR027	24.5	289/pVE41	nd
7/pVE41	97.9	289/pVE05	10.2
7/pVE05	8.2	289/pVE15	12.2
7/pVE15	26.5	289/pVE20	0.0
7/pVE20	26.5		

Foram tratadas 49 sementes/linhagem.

A avaliação foi efetuada até o sexto dia após a inoculação.

nd= não determinado

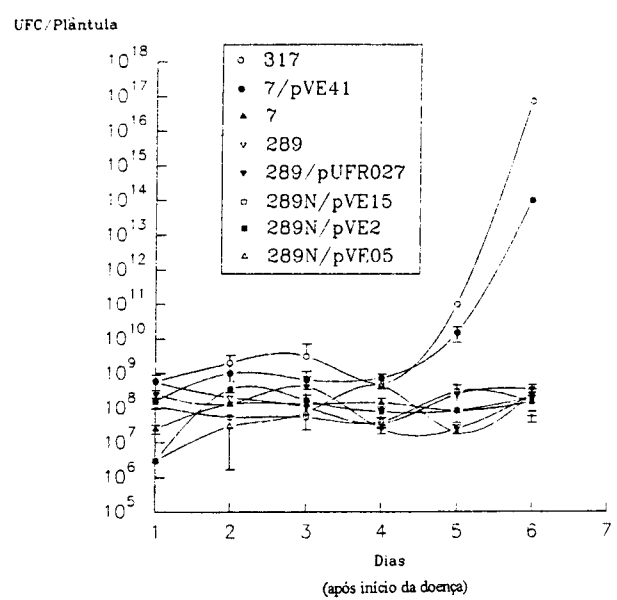
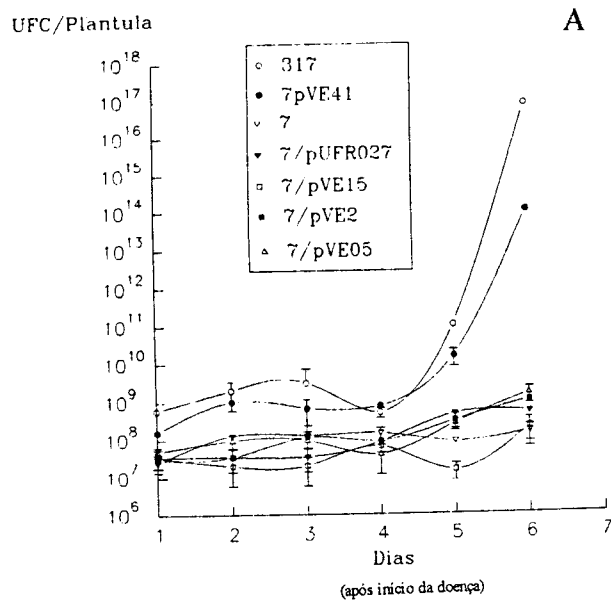


Figura 18. UFC (Unidades formadoras de colônias)/plântula no teste em sementes. A) *X. campestris* pv *vesicatoria* 317, 7/pUR027, 7/pVE41, 7/pVE05, 7/pVE15, 7/pVE20, e o mutante 7. B) *X. campestris* pv *vesicatoria* 317, *X. campestris* pv *manihotis* 289, 289/pUFR027, 289/pVE05, 289/pVE15, 289/pVE20, 7/pVE41 e o mutante 7. Os pontos são a média de 3 repetições +/- o desvio padrão.

-Teste em folhas

As folhas de tomate, inoculadas com *X. campestris* pv. vesicatoria 317 ou com o mutante complementado 7/pVE41, desenvolveram mancha escura e úmida a partir do terceiro dia de inoculação, característico da doença. Por outro lado, folhas inoculadas com 7/pVE05, 7/pVE15, 7/pVE20, 289/pVE05, 289/pVE15 e 289/pVE20 apresentaram apenas uma reação de clorose localizada.

Efetou-se uma análise em microscópio óptico com o objetivo de verificar a presença de bactérias no tecido vegetal infectado (teste de extrusão). Este teste foi feito cortando-se um fragmento da folha na interface do tecido sadio e danificado. Este fragmento foi examinado à fresco. Somente a linhagem *X. campestris* pv. vesicatoria 317 e o mutante complementado 7/pVE41 apresentaram extrusão de bactérias do tecido foliar, enquanto que as folhas inoculadas com as demais bactérias não apresentaram extrusão de bactérias. Este fato sugere que os mutantes complementados 7/pVE05, 7/pVE15, 7/pVE20 e os transformantes 289/pVE05, 289/pVE15 e 289/pVE20 não desenvolveram os sintomas de doença nas folhas de tomate possivelmente devido a incapacidade dessas bactérias de colonizar o tecido da planta, e conseqüentemente, de induzir os sintomas característicos de patogenicidade.

#### **4.3.4. Produção de Enzimas Extracelulares**

Para a produção de enzimas extracelulares, verificou-se que os três mutantes complementados 7/pVE05, 7/pVE15 e 7/pVE20 apresentaram atividade proteolítica, celulolítica e amilolítica. Apenas o mutante complementado 7/pVE05 apresentou atividade pectinolítica.

#### 4.3.5. Produção de goma xantana (EPS) pelos subclones

Os mutantes complementados 7/pVE05, 7/pVE15 e 7/pVE20 foram testados com relação a produção de goma xantana medida através da viscosidade (cps) do meio.

Verificou-se que o valor de viscosidade para o mutante complementado 7/pVE05, de 128,33 cps, não diferiu significativamente do valor da linhagem *X. campestris* pv vesicatoria 317 (132,5 cps) demonstrado na Tab.8, e que este valor foi superior ao encontrado para o mutante complementado 7/pVE41 (45 cps). Os demais mutantes (7/pVE15 e 7/pVE20) praticamente não produziram goma xantana

A produção de exopolissacarídeo revelou a existência de uma diferença significativa na viscosidade entre o fragmento EE41 do clone VE41 e o subclone KSH05 de 0,5 kb *EcoRI/HindIII*. Porém, esta diferença na viscosidade parece não estar relacionado com a patogenicidade, como foi verificado nos teste de patogenicidade dos subclones onde o mutante complementado 7/pVE05 perdeu a capacidade de induzir sintomas de doença juntamente com os outros subclones.

#### 4.4. SEQUENCIAMENTO

Foram sequenciados os subclones KSH05, KSH15, KSH2, além de outros gerados através de deleção unidirecional seguindo o método de Henikoff (1987), onde foi utilizado a enzima *SacI* (gerando extremidade 3'protuberante) e *EcoRI* (gerando extremidade 5'protuberante) nos plasmídios pKSH15 e pKSH2 (Fig. 19).

A análise da sequência do fragmento EE41 *EcoRI* foi realizada através dos programas DNASIS (Pharmacia), ESEE e CLUSTAL(Higgins & Sharp, 1988 e 1989).

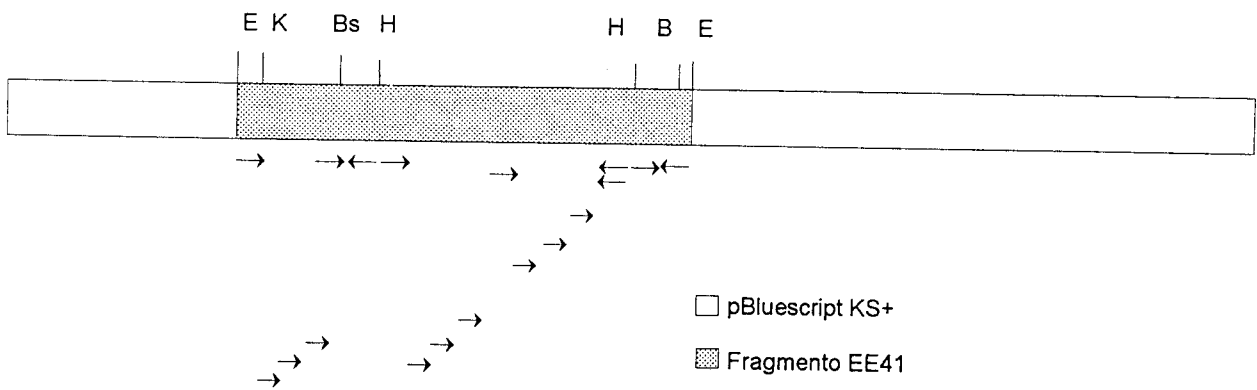


Figura 19: Representação esquemática do mapa de restrição do plasmídeo KS41 com os sítios de restrição das enzimas E: *EcoRI*; Bs: *BstXI*; H: *HindIII*; K: *KpnI*, B. *BamHI*. As setas indicam nos subclones sequenciados a direção e extensão aproximada do sequenciamento.

Verificou-se que o fragmento EE41 possui 4255 pares de bases e um conteúdo GC de aproximadamente 60% (Fig. 20).

Foram observadas duas possíveis fases de leitura (ORFs) no frame 1 com códon de iniciação ATG. A primeira ORF (1) possui 810 pares de bases, cujo possível sítio de ligação do ribossomo (5'-AGGCG-3') estaria a -15 "upstream" do ATG, a possível região promotora -10 (5'-TATCCT-3') a -28 e a possível região promotora -35 (5'-TTGTCC-3') a -50 do ATG. A segunda ORF (2) no frame 1 apresentou 385 pares de bases, cujo possível sítio de ligação do ribossomo (5'-GGTG-3') estaria a -10 do ATG, a possível região promotora -10 (5'-TATTCT-3') a -27 e a possível região promotora -35 (5'-TTGTCC-3') a -63 do ATG.

No frame 3 foi encontrada a terceira ORF(3) com 1032 pares de bases iniciando-se com CTG. O provável sítio de ligação do ribossomo (5'-CATG-3') estaria a -4 do CTG, a possível região promotora -10 (5'-TAGTAAT-3') estaria a -11 e a possível região promotora -35 (5'-TTGCCA-3') estaria a -43 do CTG.

Nos frames 2, -1, -2 e -3 não foi encontrada nenhuma possível ORF.

A análise das três ORFs dos frames 1 e 3, da sequência de 4255 pares de bases, não apresentou homologia com nenhuma sequência depositada no Genbank e Swiss Prot. Entretanto, analisando-se o frame -1, foi detectada uma identidade de 53%, num total de 45 aminoácidos com a subunidade  $\beta$  da DNA girase e da DNA topoisomerase.



A)

1 60  
5' GAATTCCTCG CAGTGACGCT TACCTTTGTT GTGGTGGGTG ATGAAGGGTG GAGGAAAGGA 120  
61 120  
AGACAGGATC CTGGGCCAGC CGAGGCCGGC CGTGGGATCA GTTCAGAGCA AAGTTGACCG 180  
121 180  
GACGCGACAC GTCCTCCGGC TTTCTGCCCG TTGACAGTGA GAGGCGTTGA ACTTCACTTC 240  
181 240  
GTGCTGCGTC ATCCGCGCCA GTCAAGGTCC GCGTTCGGCT GGACTTTTTTC AGACCGACAC 300  
241 300  
ATTGGTTCGAC TTGCCGTTGC ATCCACATCC AACCAGATGA CCTCACCTGG CATCACAAATT 360  
301 360  
GAACATGTGT GCGCTCCTTC TCTGCCGGAC TCGGGCGCCA CTGCAGGGAT CACGAACATC 420  
361 420  
ATCAGTGCAG TGAGGTGCAA GGCAATTACG AAAGCAATGC CGATAATGCG GGCCCAGGTC 480  
421 480  
AGACCCTGGT TCCCGGCATC ATAGTCATGC CGTGTGGATA ACGAGTTGTT CCGTCATGCC 540  
481 540  
GCAATGGCTC TTTCAGTGGT GTGGCCCCGG ATCACTGTGA TGATCCCCAG GTTTTCGGAC 600  
541 600  
GGCTTTGACA CCGCAGGAAC CCCAGGCTT ATACCAATCC CGAGTCCTGT AACCCTAAA 660  
601 660  
AACACAGGGA TTTCGGGGGT TTATTTTCTT TTTTACTTCA GATTGATGAT CTTCTTGGCG 720  
661 720  
TCATCAGGTT TTTTGACACC CTTGGCGATT GCTCGTGCTG CCGGCCTGAT TGGCTGGCGG 780  
721 780  
ATGCGACCTT CCGAATGCAG AAGCTTGGCC AGATTCAGAT AGGTCTCGCC GTCTTGGAAA 841  
781 -35 -10 RBS ORF3  
GCGGGTGGCC CTT**TTGCCAA** TTCTCGATCG CCTGACCTCG TGCCG**TAGTA ATCATGCTGT** 900  
841 900  
GCCAGCCAGT ATGTCTGATA TTCGGGTCAC TCCATTTTCT TCGGTCAACT GCCCGGACG 960  
901 -35 -10 RBS ORF1 960  
GCGCACG**TTG TCCATCACTG** CGGCGGCCTT **ATCCTTCTGG TCAGGCCGCG** CATATAC**ATG** 1020  
961 1020  
CTGGCCAGGT TGAGCTGGGC CTTCTTGTCG TTCGGGGTCT TGGCGGCGAC GGCTTCGGCA 1080  
1021 1080  
GCAGCCACTG CTTACCCGGT CTGGCCGCTT CGCGTAGGAC GCATCAGCAA CTGGTCCAG 1140  
1081 1140  
CTGTCTTCGG CTGCGGCGAC GCGCAATGGC TGCTTCAGCA CCGTTTTCTT TGTTCTCGGT 1200  
1141 1200  
CTTGGCGTAG ATGGAATACA ACTCCCTTGT ACTCCCTTGT ACTGGTCCAA CTGCCCGGCC 1260  
1201 1260  
AGCGCCGCTG CTTGCCATCA CTGCGGCGGC CTTGTCACTT GGTCGGCCTG CATATACATG 1320  
1261 1320  
CTGTCCAGGT TGAGCTGGGC CTTCTTGTCG TTGGCGGCGA AGCGCTTCGG GGTCTTGGCG 1380  
1321 1380  
GCGAGCACTG CTTCCGCAGC AGCACTGCTT CACCGGTCTG CGCTTCGCGT AGGACGCATC 1440  
1381 1440  
AGACTGGGCA TCGACTGGAA CTGGCCGTTG TTGTCCAGCG CATTCAAGCC GATCGCCTGC 1500  
1441 1500  
TGCACGTACT TCTTGGCAGC GCGGGTGTCT TCCATGTTGT ACGCCGCCTG GGCCAGCTGC 1560  
1501 1560  
GACGCCAGTG CTTGTCCGGC CTCGTTGGCA GCCATTGCGA GGATCTCGTC AGCCTGGCTG 1620  
1561 1620  
CGCACGGCCG GGAAGTCTTC GCCCTTGTTG AAGGTTTCGA TCAGCTTCTC CAGCTTGCAC 1680  
1621 1680  
GCATCTTGA GGAGGTTGAT CGTCGGCGGC ACGGTGGACT CCGGATACAA CTCTCAGGT 1740  
1681 1740  
CTTCGCACGG CGGAGGCGCG AATGGCCTCG TTCACGACCG GAATCGGTTT CTTGACGCGC 1800  
1741 stop1 1800  
TCGGCCTGGT ACAGCGCCTG GCCT**TAGGAT** CAGGTCTTCC GGCCCGTCGG ACTTGCTCTC

1801	TTCCAGATAC	TTGTCCAGCG	TGGAGGTTCC	TCGGTGGTGG	TGTTTCGATTC	GAACTGGCAA	1860
1861	stop3						1920
1921	GTAGATGATG	GAACTGGTTT	CAGTCCTGCA	TCTGCAACTC	GCGCCACAGT	CAGCATCGAC	1980
		-35			-10		
1981	TGGAAGTGGC	CGTTGTTGTC	CAGCGCATTC	AGGCCGATCG	CCTGCTGCAG	GTATTCCTCTG	2040
	RBS	ORF2					
2041	GCAGCGGGCG	TGTCGTCCAT	GTTGTACGCG	GCCTGGGCAT	GCGACCGCAG	TGCCTGTGTCG	2100
2101	GCCTCGTTGC	GAGCCATTGA	CGATCTCGTC	AGCCTGGCTC	GGACGGCCCG	GAAGTTGCTT	2160
2161	GTTGAAGGTC	GATCAGCTTC	TGAGTTCTGC	AGCTTGCTCG	CATCTTGAG	GAGGCTGCCG	2220
2221	GGCTGCAGTT	CGCGGATAGC	TTGGCGGGT	CGGGTGGGT	GGACAGCCAC	TGCCGCTGGC	2280
2281	GATTGCGCGT	GGCCGGCATC	ATGTTCTGCC	ATAGCGTCAC	GGCCTGGGCA	GGTCGAAGCC	2340
2341	GGCCTGGGCA	TCTGGCGCTG	GCCCACCACA	TCGGCCCTCG	CTCTCCTGGG	TACGCGAGCC	2400
2401	GGGCAGCAGG	AATACGGTCT	GGCCGGTCAT	CCCGGACCTG	stop2	CTGACTCCCCG	2460
2461	CGCCGTCGCG	TAGCGCGCAC	CGGCTAGCGC	GCCAATGATG	CCCAGGCCGG	TCTCCGCGCC	2520
2521	GAGCTGGCGG	TGATGCGCTC	TTCGTGATGG	CGGGAGATCA	CATGCCCGAT	TTCGTGCCCCG	2580
2581	AGCACGCAGC	CAGCTGATCC	TGCGTCTTGG	CGACAGTGAA	AATGCCCGTA	TTCACGCCGA	2640
2641	CCTTGCCACC	GGTTCGTGCTT	GCCGTCGGTG	CTGACTTTTT	CCTTGGCCTT	GGTCTGTGCG	2700
2701	AACGATTCGG	CGCCAAGCTT	ATCGATACCG	TGGACTGGAG	GGGGGCCGTA	CCAGCTTTTG	2760
2761	TTCCCTTTAG	TGAGGGTTAA	TTTCGAGCTT	GGCGTAATCA	TGGTCATAGC	TGTTTCCTGT	2820
2821	GTTGAAATTG	TTATCCCCTC	ACACTTCCAC	ACAACATACG	AGCCCCAACG	ATAAAGTGTA	2880
2881	AAGCCTGGCC	GCCTAATGAG	TGAGCTAACT	CACATTAATT	GCGTTGCCTC	ACTGTTGGCT	2940
2941	TCGTTATCCA	CGAACAGCAG	GCAGAGTTTC	CCAGCGGGTT	TCCGCAACTG	CACATGCGGC	3000
3001	AGTCGGCCCCA	CCAGCGCATT	GACCACGCAT	TGCACAGTAG	GCGTTCTGCT	TGCCGTCCCC	3060
3061	CTTAGCTGAC	TTTAACCTTG	GGGGTGGTCT	GCGCGAACGA	TTCGGCGCCG	AGCTTGTCGA	3120
3121	GCTGGTCCTG	CGTGACGCCT	CCCACCACCT	GTCGGCAACA	GCCTGGCTTT	CATTCAATCC	3180
3181	CCCTTGAACC	CTGGGGGCAT	TTTGGCAGGC	TCGTCTTAAC	TTTTCGTCAA	ACTGGCTCAG	3240
3241	GACCTGCCAA	AAAAGTTACA	GTGAGCTATT	CGAACTATAG	CTTAAGTGGG	TCCATAACGG	3300
3301	CTCAGGACCT	GCGCAACAAA	GTTTCAGCCA	GCTGCACGAA	CTAGAGCGCA	CGCGCGTCCA	3360
3361	GAGCGGCTAC	CGGGCAACGT	TTCCCGCTA	GCACGCAGGC	GCTTCGCGCG	CTAGAGCGAC	3420
3421	CGGGACGTGC	TAGACCACGC	GCTTCGCGTC	TAGGCCGCCG	TTGTTCTGGG	TGGGCTAGTG	3480
3481	GTCGAAGCGG	GTCCGCGTAG	CAGACAACCT	TCTCCGGTTC	GGCCGCGTCA	TGTCGGCAAT	3540
3541	TCCCGATAAC	TCACATTAAC	TGCGTGCGTT	CTGCGCTTCT	GGCACGATGC	TCCCAGTGGC	3600
3601	TGATGCATGA	GGCGAAGGCA	TGCATCGAGC	TGGTCCTGAC	GTGCGCGATC	GTCCGCACTT	3660



## 5. DISCUSSÃO

O mutante 7, isolado da linhagem *X. campestris* pv. *vesicatoria* 479 após mutação com NTG, foi caracterizado como não patogênico em plantas de tomate através de testes de patogenicidade por Marques (1992). No presente trabalho, verificou-se também que este mutante não demonstrou nenhuma alteração na produção de enzimas extracelulares e exopolissacarídeos, quando comparado com a linhagem selvagem.

O mutante 7 foi complementado com um banco genômico da linhagem de *X. campestris* pv. *vesicatoria* 317. Quatro clones, que restauraram a patogenicidade do mutante 7 foram isolados e posteriormente caracterizados neste trabalho, sendo denominados VE41, VE42, VE43 e VE44. Estes clones, quando complementando o mutante 7, foram chamados de mutantes complementados 7/pVE41, 7/pVE42, 7/pVE43 e 7/pVE44.

Nos testes de patogenicidade verificou-se que de modo geral, o mutante complementado 7/pVE41 foi o mais virulento chegando a se comparar com a linhagem selvagem *X. campestris* pv. *vesicatoria* 317. Este fato foi confirmado no teste em folha de pimentão e tomate, onde pode-se observar sintomas semelhantes ao controle positivo 317, ou seja, uma mancha irregular escura e úmida que se alastrou a partir do ponto de inoculação. Deste modo, o mutante complementado 7/pVE41 foi selecionado para posterior caracterização e análise da sequência de DNA contida no clone VE41.

No teste de hipersensibilidade feito em tabaco, uma planta não hospedeira para as linhagens testadas, verificou-se a HR (reação de hipersensibilidade). Esse resultado elimina a possibilidade do envolvimento de genes *hrp* no clone pVE41.

Os resultados obtidos indicaram portanto que o clone VE41 pode estar envolvido com o processo de reconhecimento do hospedeiro (*hsv*), já que os testes foram realizados somente com linhagens de *X. campestris* pv. vesicatoria em suas plantas hospedeiras (tomate e pimentão) ou alternativamente, do clone VE41 estar envolvido com o gene de indução específica de doença (*dsp*), pelo desenvolvimento de sintomas nas plantas hospedeiras. A possibilidade de um gene do tipo *hrp* estar envolvido neste clone foi desprezada assim como um gene do tipo *avr* pois o mutante complementado continuou patogênico para seus hospedeiros.

A possibilidade de se tratar de um gene capaz de induzir superexpressão dos genes de patogenicidade devido a genes reguladores ou efeito de dose, foi verificada transferindo-se o pVE41 para as linhagens *X. campestris* pv vesicatoria 317, *X. campestris* pv manihotis 289, *X. campestris* pv glycines 333 e *X. campestris* pv phaseoli 558, sendo testadas em suas próprias plantas hospedeiras. Os testes em folhas de tomate e pimentão, e sementes de tomate, indicaram que não houve alteração quanto a patogenicidade para a linhagem *X. c.* pv vesicatoria 317 com a transferência do pVE41. Em folhas das plantas de mandioca, soja e feijão observou-se que não houve modificação na patogenicidade das linhagens onde se introduziu o pVE41, indicando a não superexpressão desses genes.

Os trabalhos com genes *hsv* envolvem bactérias que apresentam amplo espectro de hospedeiros (Melano & Cooksey, 1988), onde mutações podem provocar o reconhecimento de novos hospedeiros ou a perda do reconhecimento. A linhagem utilizada neste trabalho, *X. campestris* pv. vesicatoria apresenta apenas dois hospedeiros: tomate e pimentão, o que dificulta a caracterização deste clone. Para comprovar a

categoria do gene em questão, foi necessária a transferência do clone VE41 para outros patovares de *Xanthomonas* visando observar se as bactérias transformantes se tornariam patogênicas para as plantas não hospedeiras destes patovares configurando uma alteração no reconhecimento de hospedeiro, o que o caracterizaria à categoria *hsv*.

Deste modo, a transferência do pVE41 foi efetuada para linhagens de *Xanthomonas* incompatíveis com tomate (*X. campestris* pv manihotis 289, *X. campestris* pv glycines 333 e *X. campestris* pv phaseoli 558). Os testes em semente e folhas de tomate (Tabelas 6 e 7) juntamente com os gráficos de crescimento bacteriano (Figura 13) em plântula confirmaram que não houve alteração na patogenicidade pela introdução de pVE41 em nenhuma das linhagens onde este foi introduzido. No teste em folha verificou-se apenas um HR atípico, ou seja, uma clorose tardia (após o 3º dia) que se alastrou além do ponto de inoculação com necrose localizada do tecido. Estes resultados indicaram que pVE41 não pode ser também reconhecido como *hsv*, tratando-se possivelmente de um gene do tipo *dsp*. Estes genes estão envolvidos com o desenvolvimento de sintomas em plantas hospedeiras não possuindo nenhuma relação com o desenvolvimento de hipersensibilidade em plantas não hospedeiras.

Genes do tipo *dsp* foram descritos por Boucher *et al.* (1987), que isolaram um “cluster” de genes de patogenicidade em *Pseudomonas solanacearum*, cuja função seria o aumento da agressividade do patógeno em tomate. Baseando-se em trabalhos como os de Daniels *et al* (1984) e Turner *et al.*(1985), este mesmos autores consideraram os genes *dsp* como genes que codificariam produtos envolvidos com a patogenicidade, podendo ser, neste caso, uma enzima extracelular, ou qualquer fator envolvido no controle da

Genes do tipo *dsp* foram descritos por Boucher *et al.* (1987), que isolaram um “cluster” de genes de patogenicidade em *Pseudomonas solanacearum*, cuja função seria o aumento da agressividade do patógeno em tomate. Baseando-se em trabalhos como os de Daniels *et al* (1984) e Turner *et al.*(1985), estes mesmos autores consideraram os genes *dsp* como genes que codificariam produtos envolvidos com a patogenicidade, podendo ser, neste caso, uma enzima extracelular, ou qualquer fator envolvido no controle da síntese ou secreção de enzimas necessárias para colonização de um hospedeiro por um patógeno.

Genes do tipo *dsp* foram também descritos em *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria por Seal *et al* (1990) com o isolamento do mutante M461 que produziu apenas uma clorose em tomate e pimentão (plantas hospedeiras) e manteve a capacidade de induzir reação de hipersensibilidade em tabaco (não hospedeira). O clone p6AD4 foi capaz de restaurar a patogenicidade do mutante. Não houve novas publicações dando continuidade a este trabalho ou a outros sobre este tipo de gene. Neste trabalho, verificou-se que o mutante 7 não demonstrou alteração para produção de enzimas extracelulares e de exopolissacarídeo, eliminando a correlação destes produtos com a patogenicidade. Este fato, concorda com os trabalhos feitos por Seal *et al.* (1990)), que isolaram um mutante não patogênico que produzia normalmente as enzimas extracelulares, e Beaulieu *et al.* (1991), que demonstraram que enzimas pécticas não tem papel na patogenicidade

A hibridização dos DNAs genômicos dos patovares phaseoli, citri, aberrans, glycines, campestris e vesicatoria, demonstrou que o inserto EE41, utilizado como sonda, está presente em todas as linhagens, com exceção de *X. campestris* pv. manihotis 289 e *E.*

*coli* DH5 $\alpha$ . Esta homologia sugere que funções semelhantes podem existir nos diferentes patovares e/ou linhagens, exceto pela linhagem *X. campestris* pv. *manihotis* 289.

O polimorfismo de bandas verificado na hibridização dentro do patovar vesicatoria possibilita a utilização de EE41 para classificar linhagens de *X. campestris* pv vesicatoria de acordo com o tamanho da banda de hibridização, considerando-se que as linhagens específicas para tomate tem uma banda de hibridização de 4 kb e aquelas específicas para pimentão tem uma banda de hibridização de 12 kb. Jones *et al.* (1993) verificaram um fato semelhante, onde uma única região de um fragmento de DNA foi utilizada para diferenciar os subgrupos A e B de *X. campestris* pv vesicatoria. Stall *et al.* (1994) demonstraram através da hibridização DNA-DNA a ocorrência de diferenças genéticas entre estes dois subgrupos desta linhagem. Essas diferenças genéticas distinguiram tão bem estes dois subgrupos, que levou Vauterin *et al* (1995) a classificá-los como espécies diferentes. O subgrupo A passou a pertencer a espécie *X. axonopodis* pv. vesicatoria e o subgrupo B passou a pertencer a espécie *X. vesicatoria*.

Neste trabalho a linhagem *X. campestris* pv vesicatoria 332, que possui especificidade para tomate, é uma exceção pois apresentou uma banda de 12 kb.

Na comparação do perfil de proteínas totais, verificou-se que uma banda de 32 kDa está numa concentração inferior ou ausente no mutante 7 quando comparada as linhagens *X. campestris* do patovar vesicatoria 317 e 479. Esta banda foi usada por alguns autores juntamente com a banda de 27 kDa, para dividir o patovar vesicatoria em subgrupos A e B de acordo com a presença da banda  $\alpha$  (32 kDa) e  $\beta$  (27 kDa), respectivamente (Jones *et al*, 1993; Bouzar *et al.*, 1993 e Stall *et al.*, 1994). Existe uma



alta correlação entre a presença da banda  $\alpha$  e  $\beta$  e outros fenótipos, tais como a hidrólise do amido, a degradação do pectato e a patogenicidade para determinados hospedeiros. A banda  $\alpha$  (32 kDa) estaria presente nas linhagens de *X. campestris* pv vesicatoria patogênicas para pimentão, e a banda  $\beta$  (27 kDa) estaria presente nas linhagens patogênicas para tomate. Em vista disto, podemos supor que a deficiência do mutante 7 esteja relacionada com proteína de 32 kDa, que estaria sendo expressa deficientemente, e por consequência, que esta proteína estaria relacionada com a perda da patogenicidade deste mutante em seu hospedeiro.

Verificou-se também, a presença de uma banda nova de ~27 kDa em todos os mutantes complementados, que está ausente no mutante 7, 7/pUFR027 e na linhagem selvagem *X. campestris* pv. vesicatoria 317. O aparecimento dessa nova banda pode ser atribuído a uma síntese “de novo” ou a expressão aumentada dessa proteína induzida pela presença do fragmento EE41. Este fato nos leva a sugerir que a complementação do mutante 7 não deve ter ocorrido de maneira direta, por reaparecimento da proteína de 32 kDa, mas por uso de uma outra via e possivelmente com participação da proteína de ~27 kDa, juntamente com as outras bandas diferenciais em cada mutante.

Novos estudos em relação a esta proteína de 27 kDa devem ser realizados visando uma melhor definição do seu papel na complementação do mutante 7 e sua participação na patogenicidade, onde poderão ser utilizados técnicas mais específicas, como por exemplo, imunoblotting (Bradbury *et al.*, 1984), para detectar até mesmo outras proteínas em concentrações inferiores que poderiam ser também importantes para patogenicidade.

Os mutantes complementados 7/pVE05, 7/pVE15 e 7/pVE20 não foram capazes de induzir sintomas de patogenicidade diferindo portanto do mutante complementado original contendo o pVE41. Isso indica a possibilidade de que uma região importante envolvida com a patogenicidade foi rompida na subclonagem. Portanto, não foi possível restringir o fragmento de DNA responsável pela patogenicidade em tomate contido no inserto EE41.

A análise da sequência do fragmento EE41, de 4255 pb revelou um conteúdo de 60% de GC. Este alto conteúdo de GC em *X. campestris* foi relatado também por Hu *et al.* (1992) de 63,4% e por Destefano (1993) de 66,4%. Liu *et al.* (1990) relataram que na sequência do gene *amy*, para organismos com alto conteúdo GC, na terceira base de cada códon teria um G ou C numa taxa de 80%. Este fato é utilizado para ajustar o frame correto na leitura.

O estudo das ORFs encontradas no inserto EE41, parece ser promissor uma vez que não apresentou homologia com nenhuma sequência depositada nos bancos de dados, se tratando portanto, de uma sequência ainda não descrita na literatura.

No entanto, no frame -1, verificou-se uma identidade de 52% num total de 44 aminoácidos com a subunidade  $\beta$  da DNA girase e da DNA topoisomerase. Estas topoisomerasas, cujo tamanho de 806 aminoácidos, são responsáveis pelo superenovelamento negativo do DNA, tendo também um papel nos processos de replicação, transcrição e recombinação do DNA (Dorman, 1991). Esta identidade de topoisomerasas com uma pequena região do inserto EE41 não esclarece porque este fragmento é capaz de

restaurar a patogenicidade do mutante 7 tendo em vista que a função destas proteínas ainda não foram relatadas como sendo importantes para a patogenicidade.

## 6. CONCLUSÕES

Os testes de patogenicidade em plantas de tomate indicaram que o fragmento EE41 está envolvido com patogenicidade, podendo conter gene(s) do tipo *dsp*.

Na hibridização de DNAs genômicos das linhagens de *X. campestris* pv. citri, glycines, aberrans, campestris, phaseoli e vesicatoria observou-se regiões homólogas do DNA das bactérias testadas com o fragmento EE41, com exceção da linhagem de *X. campestris* pv. manihotis 289. A variação existente na hibridização de linhagens do patovar vesicatoria e o fragmento EE41, pode ser utilizado para distinguir este patovar em subgrupos A e B, de acordo com o hospedeiro (tomate ou pimentão).

A menor intensidade da banda de 32 kDa no mutante 7 oferece indícios do envolvimento dessa proteína com a característica não patogênica do mutante. A existência de bandas diferenciais nos clones VE41, VE42, VE43 e VE44, parece ser responsável pela complementação do mutante restabelecendo sua patogenicidade. Esta complementação ainda não está esclarecida, tornando necessário mais estudos desta proteína de 32 kDa.

A região no fragmento EE41, onde se localizam um ou os dois sítios de *HindIII*, ou o fragmento inteiro, parecem ser importantes para a patogenicidade uma vez que a sua subclonagem levou a perda deste fenótipo.

O fragmento EE41 apresentou 4255 pares de bases e três ORFs que não apresentaram homologia com nenhuma sequência depositada no Genbank e Swiss Prot. No entanto, no frame -1, verificou-se uma identidade de 52% num total de 44 aminoácidos com DNA girase e topoisomerase.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G. N. (1988). Plant pathology. Introduction of plant pathology. Academic Press, San Diego, CA.
- Agrios, G. N.(1989). **Plant Pathology**, 3 Ed. Academic Press. Inc. San Diego, California.
- Arlat, M. & Boucher, C. (1991). Identification of a dsp DNA region controlling aggressiveness of *Pseudomonas solanacearum*. **Mol. Plant-Microb Interac.**, 4 : 211-213.
- Arlat, M.; Gough, C. L.; Barber, C. E. ; Boucher, C. & Daniels, M. j. (1991). *Xanthomonas campestris* contains a cluster of hrp genes related to the larger hrp cluster of *Pseudomonas solanacearum*. **Molecular Plant-Microb. Interac.**,4(6): 593-601.
- Alippi, A. M. (1992). Histopatologia de hojas de tomate inoculadas con *Xanthomonas campestris* pv vesicatoria. **Agronomia.**, 12: 115-122.
- Beaulieu, C.; Minsavage, G. V. ; Canteros, B. I. & Stall, R. E. (1991). Biochemical and genetic analyses of a pectate lyase gene from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. **Mol. Plant-Microbe Interec.**, 4: 446-451.
- Beaulieu, C. & Van Gijsegem, F. (1990). Identification of plant-inducible genes in *Erwinia chrysanthemi* 3937. **J. Bacteriol.** 172: 1569-1575.
- Bennett, R. A. & Billing, E. (1978). Capsulation and virulence in *Erwinia amylovora*. **Ann. of Appl. Biol.**, 89:41-45.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucl. Acids. Res.**, 7:1513-1523.
- Blum, H.; Beier, H. & Gröss, H. J. (1987). Improved silver stainng of plant proteins. RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, 8:93-99

- Bocarra, M.; Diolez, A.; Rouve, M. & Kotoujansky, A. (1988). The role of individual pectate lyases of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937 in pathogenicity on saintpaulia plants. **Physiol. Mol. Plant. Pathol.**, **33**:95-104.
- Bonas, U.; Stall, R. E. & Staskawicz, B. (1989). Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas*. **Mol. Gen. Genets.**, **218**: 127-136.
- Bonas, U.; Schulte, R., Fenselau, S.; Minsavage, G. V.; Staskawicz, B. J.; Stall, R. E. (1991). Isolation of a gene cluster from *Xanthomonas Campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. **Mol. Plant -Microbe Inter.**, **4**: 81-88.
- Boucher, C.; Van Gijsegem, F; Barberis, P. A.; Alart, M.; Zischek, C. (1987). *Pseudomonas solanacearum* genes controlling both pathogenicity on tomato and hypersensitivity on tobacco are clustered. **J. Bacteriol.**, **169**:5626-5632.
- Bouzar, H.; Jones, J. B.; Minsavage, G. V.; Stall., R. E.; Scott, J. W. (1993). Proteins unique to phenotypically distinct groups of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by silver staining. **Phytopathology**, **84**(1):39-44.
- Bouzar, H.; Jones, J. B.; Stall, R. E.; Hodge, N. C.; Minsavage, G. V.; Benedict, A. A. & Alvarez, A. M. (1994). Physiological, chemical, serological, and pathogenic analyses of a worldwide collection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strains. **Phytopathology**, **84**(7):663-671.
- Bradbury, W. C.; Mills, S. D.; Preston, M. A.; Barton, L. J. & Penner, J. L. (1984). Detection of lipopolysaccharide in polyacrylamide gels by transfer to nitrocellulose followed by immunautoradiography with antibody and <sup>125</sup>I-protein A: "LPS blotting". **Anal. Biochem.**, **137**:129-133.
- Canteros, B. Minsavage, G. Bonas, U. Pring, D. & Stall, R. (1991). A gene from *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* that determines avirulence in tomato is related to *avrBs3*. **Mol Plant-Microbe Interac.**, **4**: 628-632.

- Chatterjee, A. K. & Vidaver, A.K. (1986) Genetics of pathogenicity factors: application of phytopathogenic bacteria. **Adv. Plant Pathol.**, **4**: 1- 218.
- Collmer, A & Keen, N. T. (1986). The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. **Ann. Rev. Phytopathol.**, **24**: 383-409.
- Coplin, D. L. (1989). Plasmids and their role in the evolution of plant pathogenic bacteria. **Ann. Rev. Phytopathol.**, **27** 187-212.
- Coplin, D. L. & Cook, D. (1990). Molecular genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. **Mol. Plant Microbe-Interac.**, **5**:271-279.
- Cox, R. S.; Conover, R. A. & Sowell, G. (1956). Symptomology of bacterial spot of pepper and tomato in southern Florida. **Phytopathology**, **46**:582-584.
- Crecy-Lagart, V.; Glaser, P. ; Lejeune, P., Sismeiro, O; Barber, C. E. Daniels, M. J. & Danchin, A. (1990). A *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* protein similar to catabolic Activation factors is involved in regulation of phytopathogenicity. **Journal of Bacteriology**, **172**(10) 5877-5883.
- Daniels, M. J.; Barber., C. E.; Turner, P. C.; Sawczyc, M. K.; Byrde, R. J. W. & Fielding, A. H. (1984). Cloning on gene involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. **EMBO J.**, **3**: 3323-3328.
- Daniels, M. J.; Collinge, D. B.; Dow, J. M.; Osbourn, A. E.; Roberts, I. N. (1987). Molecular genetics of pathogenicity in phytopathogenic bacteria. **Ann. Rev. Phytopathol.**, **25**: 353-359.
- Daniels, M. J. Dow, J. M. & Osbourn, A. E. (1988). Molecular genetics of pathogenicity in phytopathogenic bacteria. **Ann. Rev. Phytopathol.**, **26**: 285-312.
- Daniels, M. J. (1989). **Pathogenicity of *Xanthomonas campestris* towards plants.** In: Hopwood, D. A. & Cahter, K. F. ed Genetic of Bacterial Diversity, 1898, Academic Press.

- DeFeyter, R. Kado, C. I. & Gabriel, D. W. (1990). Small, stable shuttle vectors for use in *Xanthomonas campestris*. **Gene**, **88**: 65-72.
- Destefano, S. A. L. (1993). Isolamento e análise do clone pMV08 envolvido com a biossíntese do exopolissacarídeo de *Xanthomonas campestris* Tese de Doutorado. Unicamp. Campinas, S.P.
- Dorman, C. J. (1991). DNA supercoiling and environmental regulation of gene expression in pathogenic bacteria. **Infect. Immun.**, **59**:745-749.
- Dow, J. M.; Scofield, G. Trafford, K.; Turner, P. C. & Daniels, M. J. (1987) A gene cluster in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* required for pathogenicity controls the excretion of polygalacturonate lyase and other enzymes. **Physiol. Mol. Plant**
- Dow, J. M.; Milligan, D. e.; Jamieson, L.; Barber, C. E. & Daniels, M. (1989). Molecular cloning of a polygalacturonate lyase gene from *Xanthomonas campestris* pv *campestris* and role of the gene product in pathogenicity. **Physiol. Mol. Plant. Pathol.**, **35**: 113-120.
- Fenselau, S.; Balbo, I. & Bonas, U. (1992). Determinants of pathogenicity in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are related to proteins involved in secretion in bacterial pathogens of animals. **Mol. Plant-Microbe Interac.**, **5**: 390-396.
- Ferreira, H. Barrientos, F. J. A.; Baldini, R. L. & Rosato, Y. B (1995). Electrotransformation in three patovars of *Xanthomonas campestris*. **Appl. Microb. and Biotechno.**, **43**:651-655.
- Flor, H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. **Ann. Rev. Phytopathol.**, **9**:275-296.
- Gonçalves, E. R. (1996) Caracterização de um clone *hsv* e obtenção de mutantes não patogênicos de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Tese de Mestrado. Unicamp. Campinas, S. P.



- Goss, T. J.; O'Hara, G. W.; Dilwoeth, M. J. & Glenn, A. R. (1990). Cloning characterization, and complementation of lesion causing acid sensitivity in Tn5-induced mutants of *Rizobium melilot* WSM419. **J. Bacteriol.**, **172**: 52173-5179.
- Gough., C. L.,; Dow, J. M.; Barber, C. E. & Daniels, M J. (1988). Cloning of two endoglucanase genes of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: Analysis of role of the major endoglucanase in pathogenesis. **Mol. Plant-Microbe Interac.**, **1** 275-281.
- Higgins, D. G. & Sharp, P. M. (1988). CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignments on a microcomputer. **Gene**, **73**:237-244.
- Higgins, D. G. & Sharp, P. M. (1989). Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. **CABIOS**, **5**:151-153.
- Henikoff, H. (1987). Unidirectional digestion with exonuclease III in DNA sequence analysis. **Methods in Ensimology**, **155**:156-165.
- Hu, N. T.; Hung, M.; Chiou, S.; Tang, F.; Chiang, D.; Huang, H. & Wu, C. (1992) Cloning and characterization of a gene required for the secretion of extracellular enzymes across the outer membrane by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* L. **Bacteriol.**, **174**: 2679-2687.
- Hwang, I.; Lim, S M. & Shaw, P. D (1992) Cloning and characterization of pathogenicity genes from *Xanthomonas campestris* pv *glycines* **J. of Bacteriol.**, **174**: 1923-1931.
- Jeanes, A.; Pittsley, J. E. & Senti, F. R. (1961) Polyelectrolyte produced from glucose by bacterial fermentation. . **J. Appl. Polymer. Sci.**, **5**: 519-526.
- Jones, J. B.; Minsavage, G. V.; Stall, R. E.; Kelly, R. O.; Bouzar, H. (1993). Genetic analysis of a DNA region involved in expression of two epitopes associated with lipopolysaccharide in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology.**, **83**:551-556.
- Kamoun, S. & Kado, C. I. (1990). A Plant-inducible gene of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* encodes an extracellular component required for growth in the host and hypersensitivity on nonhosts. **J. Bacteriol.**, **172**: 5165-5172.

- Kamoun, S.; Young, M.; Glascock, C. B. & Tyler, B. M. (1993). Extracellular protein elicitors from *Phytophthora*: host-specificity and induction of resistance to bacterial and fungal phytopathogens. **Mol. Plant-Microbe Interac.**, **6**: 15-25.
- Kao, C. C.; Barlow, E. & Sequeira, L. (1992). Extracellular polysaccharide is required for wild-type virulence of *Pseudomonas solanacearum*. **J. Bacteriol.**, **174**:1068-1071.
- Kearney, B. & Staskawicz, B. J. (1990) Widespread distribution and fitness contribution of *Xanthomonas campestris* avirulence gene *avrBs2*. **Nature**, **346**: 385-386.
- Keen N. T. & Staskawicz, B. J. (1988). Host range determinants in plant pathogens and symbionts. **Ann. Rev. Microbiol.**, **42**:421-440.
- Klement, Z & Goodman, R. N. (1967). The role of the living cell and induction time in the hypersensitive reaction in the tobacco plant. **Phytopathology.**, **57**: 322-323.
- Kotoujansky, A. (1987). Molecular genetics of pathogenesis by soft-rot *Erwinias*. **Ann. Rev. Phytopathol.**, **25**: 405-430.
- Laemmel, L. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. **Nature**, **227**:680-685.
- Leyns, F. Declere, M.; Swings, J. G. & Deley, J. (1984). The host-range of the genus *Xanthomonas*. **Bot. Rev.**, **50**:8724-8730.
- Lindgreen, P. B.; Peet, R. C.; & Panopoulos, N. J. (1986). Gene "cluster" of *Pseudomonas syringae*, pv. *phaseolicola* controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. **J. Bacteriol.**, **168**:512-522.
- Liu, Y. N.; Tang, J. L.; Clarke, B. R.; Dow, M. & Daniels, M. J. (1990). A multipurpose broad host range cloning vector and its use to characterise an extracellular enzyme across the outer membrane by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Mol. and Gen. Genetics**, **220**:433-440.
- Marques, L. L. R. (1992). Isolamento de genes envolvidos na patogenicidade de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Tese de Mestrado. UNICAMP. Campinas, S. P.

- Marques, L. L. R. & Rosato, Y. B. (1995) Patogenicidade de diferentes isolados de *Xanthomonas campestris* em hipocótilo de tomateiro. **Fitopatol. Brasilei.**, **20**:244-247.
- McCammon, S. L.; Coplin, D. L. & Rowan, R. G (1985). Isolation of avirulent mutants of *Erwinia stewartii* using bacteriophage Mu pf7701. **J. Gen. Microbiol.**, **131**: 2993-3000
- Mellano, V. J. & Cooksey, D. A. (1988). Development of host range mutants of *Xanthomonas campestris* pv *translucens*. **App. Environ. Microbiol.**, **54**: 884-889
- Minsavage, G. V.; Canteros, B. I. & Stall, R. E. (1990a). Plasmid-mediated resistance to streptomycin in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology**, **80**:719-723.
- Minsavage, G. V.; Dahlbeck., D.; Whalen, M. C.; Kearney, B.; Bonas, U.; Staskawicz, B, J, & Stall, R. E. (1990b). Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* - pepper interactions. **Mol. Plant-Microbe Interac.**, **3**:41-47
- Morgan, M. K. & Chatterjee, A. K. (1985). Isolation and characterization of Tn5 insertion mutants of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* altered in the production of the peptide phytotoxin syringotoxin. **J. Bacteriol.**, **164**:14-18.
- Murashige, T. & Skoog, S. (1962). A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant**, **15**:473-497.
- Niepold, F.; Anderson, D. & Mills, D. (1985). Cloning determinants of pathogenesis from *Pseudomonas syringae* pathovar *syringae*. **Proc Natl. Acad. Sci.**, **82**: 406-410.
- Osbourn, A. E.; Barber, C. E. & Daniels, M. J. (1987). Identification of plant-induced genes of the bacterial pathogen *Xanthomonas Campestris* pv. *vesicatoria* using a promoter-probe plasmid. **EMBO J.**, **6**: 23-28.

- Patil, S. S.; Hayward, A. C. & Emmos, R. (1974). An ultraviolet induced non-toxigenic mutant of *Pseudomonas phaseolicola* of altered pathogenicity. **Phytopathology**, **64**: 590-595.
- Reifschneider, G. J. B.; Bongliolo, N. A. & Takatsu, A. (1985). Reappraisal of *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* strains - Their terminology and distributions. **Fitopatol. Bras.**, **10**: 201-204.
- Ried, J. L. & Collmer, A. (1988). Construction and characterization of an *Erwinia chrysanthemi* mutant with directed deletions in all of the pectate lyase structural genes. **Mol. Plant-Microbe Interac.**, **1**:32-38
- Roberts, D. P.; Denny, T. P. & Schell, M. A. (1988). Cloning of the *egl* gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in pathogenicity. **J. Bacteriol.**, **170**:1445-1451.
- Romeiro, R. S. (1985). Bactérias como fitopatógenos. **Inf. Agropec.**, **11**:16-20
- Ronald, P. & Staskawicz, B. (1988). The avirulence gene *avrBs1* for *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* encodes a 50 kDa protein. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, **5**: 191-198.
- Rosato, Y. B.; Destefano, S. A. L. & Daniels, M. J. (1994). Cloning of a locus involved in pathogenicity and production of extracellular polysaccharide and protease in *Xanthomonas campestris* ov *campestris*. **FEMS Microbiology letters**, **117**:41-46.
- Sambrook, J.; Fritsh, E., F. & Maniats, T. (1989). **Molecular cloning a laboratory manual**. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N. Y. USA.
- Schell, M. A.; Roberts, D. P. & Denny, T. P. (1988). Analysis of the *Pseudomonas solanacearum* polygalacturonate encode by *pglA* and its involvement in pathogenicity. **J. Bacteriol.**, **170**: 4501-4508.
- Seal, S. E.; Cooper, R. M. & Clarkson, J. M. (1990). Identification of a pathogenicity locus in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Mol. Gen. Genet.**, **222**: 452-456.

- Shaw, J. L.; Settles, L. G. & Kado, C. I. (1988). Transposon Tn4431 mutagenesis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: characterization of a nonpathogenic mutant and cloning of a locus for pathogenic mutant and cloning of a locus for pathogenicity. **Mol. Plant-Microbe Interac.**, 1: 39-45.
- Shulte, R. & Bonas, U. (1992). Expression of the cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. **J. Bacteriol.**, 174: 815-823.
- Sow, P. & Domain, A. L. (1979). Nutritional studies on Xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL-B1459. **Appl. Environm. Microbiol.**, 31:1186-1192.
- Stall, R. E.; Loschke, D. C. & Jones, J. B. (1986). Linkage of copper resistance and virulence loci on a self-transmissible plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology**, 76:240-243.
- Stall, R. E.; Beaulieu, C.; Egel, D.; Hodge, N. C.; Leite, R-P.; Minsavage, G. V.; Bouzar, H.; Jones, J. B.; Alvarez, A. M. & Benedict. A. A. (1994). Two genetically diverse groups of strain are "cluster" in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Intern. J. Syst. Bacteriol.**, 44(1):47-53.
- Staskawicz, B. J.; Dahlbeck, D. & Keen, N. T. (1984). Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on *Glycine max* (L). **Merr. proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 81:6024-6028.
- Staskawicz, B. J.; Ausubel, F. M.; Baker, B. J.; Ellis, J. G. & Jones, J. D. G. (1995). Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, 268:661-666.
- Steinberger, E. M & Beer, S. (1984). Isolation and mapping of Tn5 mutations in pathogenicity genes of *Erwinia amylovora*. **Phytopathology**, 74:797
- Swanson, J.; Kearney, B.; Dahlbelk, D.; & Staskawicz, B. (1988). Cloned avirulence gene of *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* complements spontaneous race-change mutants. **Mol. Plant-Microbe Interac.**, 1: 5-9.

- Tang, J. L.; Gough, C.; Barber, C. E.; Dow, J. M. & Daniels, M. J. (1987). Molecular cloning of a protease gene(s) from *Xanthomonas campestris* pv *campestris*: expression in *Escherichia coli* and role in pathogenicity. **Mol. Gen. Genet.**, **210**:443-448.
- Tang, J. L.; Liu, Y. N.; Barber, C. E.; Dow, J. M.; Wootton, J. C. & Daniels, M. J. (1991). Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. **Mol. Gen. Genet.**, **226**: 409-417.
- Turner, T.; Barber, C. & Daniels, M. (1984). Behaviour of the transposons Tn5 e Tn7 in *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. **Mol Gen. Genet**, **195**: 101-107.
- Turner, P.; Barber, C. & Daniels, M. J. (1985). Evidence for clustered pathogenicity genes in *Xanthomonas campestris* pv *campestris* . **Mol. Gen. Genet.**, **199**: 338-343.
- Van den Mooter, M; Swings, J.; Gosselé, F.; Kersters, K.; Kersters, P. & De Ley, J. (1987). The taxonomy of *Xanthomonas* Dowson 1939, p. 795-796. In Civerolo, E. L.; Collmer, A.; Davis, R. E. & Gillaspie, A. G. (ed.), Plant pathogenic bacteria. Martinus Nijhoff Publishers, Boston.
- Vauterin, L.; Swings, J. & Kersters, K. (1991). Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars by SDS-PAGE of proteins. **J, Gen. Microbiol.**, **137**:1677-1687.
- Vauterin, L.; Hoste, B.; Kersters, & K Swings, J. (1995). Reclassification of *Xanthomonas*. **J. Syst. Bacteriol.**, **45**(3):472-489.
- Waney, V. R.; Kingsley, M. T. & Gabriel, D. W. (1991). *Xanthomonas Campestris* pv. *translucens* genes determining host-specific virulence and general virulence on cereals identified by Tn5-gusA insertion mutagenesis. **Mol. Plant-Microbe Interac.**, **4**: 623-627.

White, T. J. & Gonzales, C. F. (1991). Application of electroporation for efficient transformation of *Xanthomonas campestris* pv *oryzae*. **Phytopathology.**, **81**: 5521-524.

Wooley, D. W.; Pringle, R. B. & Braun, A. C. (1952). Isolation of the phytopathogenic toxin of *Pseudomonas tabaci*, an antagonist of methionine. **J. Biol. Chem.**, **197**:409-417.