



# Caracterização de um clone *hsv* e obtenção de mutantes não patogênicos de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

**Edmilson Ricardo Gonçalves**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Yoko Bomura Rosato

Campinas -S.P.

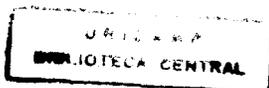
1996

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) Edmilson Ricardo Gonçalves e aprovada pela Comissão Julgadora.

15/01/96

T/UNICAMP

G586<sub>C</sub>



UNIDADE	I B		
N.º CHAMADA:	17/10/11 P		
	B 5860		
V. Ex.			
TOMBO BS/	27023		
PROC.	66796		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 17,00		
DATA	13/3/96		
N.º CPD.	C.M.00085094.6		

LOCAL E DATA: Campinas, 15 de Janeiro de 1996

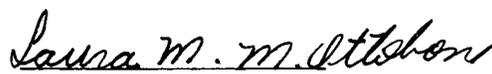
BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

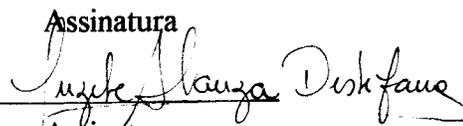
Profa. Dra. Yoko Bomura Rosato (Orientadora)

  
Assinatura

Profa. Dra. Laura Maria M. Ottoboni

  
Assinatura

Profa. Dra. Susete Lanza Destefano

  
Assinatura

SUPLENTE:

Prof. Dr. Paulo Mazzafera

\_\_\_\_\_  
Assinatura

APROVADA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

G586c      Gonçalves, Edmilson Ricardo  
              Caracterização de um clone HSV e isolamento de  
mutantes não patogênicos de *Xanthomonas campestris*  
pv. vesicatória / Edmilson Ricardo Gonçalves. --  
Campinas, SP : [s.n.], 1996.

              Orientador: Yoko Bomura Rosato.  
              Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas. Instituto de Biologia.

              1. *Xanthomonas campestris*. 2. Bactérias  
fitopatogênicas. I. Rosato, Yoko Bomura. II. Universidade  
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**A meus super-heróis, Super “J” e Super “Bê”, meus pais, por terem me concedido a vida e por me darem tantos motivos para amá-la.**

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Yoko Bomura Rosato, que além de “chefe”, sempre mostrou-se amiga, por ter acreditado em mim e me ajudado a crescer como profissional;

À Profa. Dra. Laura M. M. Ottoboni pela agradável convivência no laboratório e pelas dicas durante a pré-banca;

À Dra. Susi pela paciência em me ensinar os primeiros passos no laboratório, pela amizade e também pela ajuda durante a pré-banca;

Ao Prof. Dr. Paulo Mazzafera pelas sugestões apresentadas durante a análise prévia deste trabalho;

À Prof. Alzira F. Loretto que me mostrou o maravilhoso mundo da Biologia e sempre acreditou no meu potencial;

À quase francesa Andréa Pimenta pelas fantásticas discussões que me conduziram ao “Reino Encantado da Genética Molecular”, merci Beaucoup, Andréa.

Aos Super-amigos do laboratório: Sandra Eugênia, “n.w.” (que insiste em dizer que se chama Sandra Tahara), Zé (vulgo Henrique), Bebê (também conhecido como Luís Otávio. Quem?) e Fabiana (a “Pi” do lab) pela amizade e excelente convivência durante esses últimos anos e também pela grande ajuda que me deram. Valeu minhas crianças!

À amiga Geórrrrrgia por ter me aturado anos no lab, pela grande ajuda e por ter me apresentado a grande Rio;

Aos queridos técnicos Wilson e Sandra pela ajuda e simpatia nesse tempo todo de convivência;

Aos “Meigoamigos” Leelão e “ermã”, à “irmã siamesa” Mar (MáMá), à Maura (também conhecida como Mara, a noiva), à recente mas já velha amiga Juzinha (a muié de metros) à querida amiga Ivy(que insiste em chamar meu amigo Zé de Henrique. Um dia ela aprende!), e à Luzinha apela amizade, carinho, ajuda e boas gargalhadas por todo esse tempo;

Ao rabujento “Sibinho”, que adora Triggy (e à Lu por tê-lo domesticado) pela amizade e pelas trapalhadas e enrascadas que me meteu nesses anos;

Às queridas crianças Rachelzinha, Germano (o querido Petit b.), Andrés, Dante pela ajuda que me deram e pela super agradável relação de convivência inter-lab;

À grande Rosângela, a expert em Fotografia, que sempre me socorreu nas horas de desespero e à Berê pela ajuda no sequenciamento;

À Super secretária TERESA da Secretaria da Genética pela força prestada esses anos todos e pela simpatia contagiante;

Às secretárias do CBMEG, Cláudia, Sandra e Tânia que sempre se mostraram excelentes profissionais;

Aos meus irmãos Bubi e Rê e às minhas fofíssimas sobrinhas “Lulis” e “Tatá” que dão cores à minha vida;

Agradecimentos especiais aos meus pais por terem acreditado em mim.

À FAPESP e aos meus pais pelo apoio financeiro.

# Índice

<b>Resumo</b> .....	10
<b>Summary</b> .....	13
<b>Abreviações</b> .....	15
<b>Introdução</b> .....	16
<b>Revisão de literatura</b> .....	20
1-Bactérias fitopatogênicas.....	20
1.1 - <i>Xanthomonas campestris</i> .....	20
1.1.1 - <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> .....	21
1.2 - Fatores envolvidos na patogenicidade .....	22
1.2.1 - Genes de patogenicidade.....	24
1.2.1.1 - Genes de avirulência: <i>avr</i> .....	26
1.2.1.2 - Genes de especificidade de hospedeiro: <i>hsv</i> .....	30
1.2.1.3 - Genes específicos de doença: <i>dsp</i> .....	34
1.2.1.4 - Genes de patogenicidade e de resposta de hipersensibilidade: <i>hrp</i> .....	35
<b>Parte I -Caracterização de um gene <i>hsv</i> de <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i></b>	
<b>I-1 - Material e métodos</b>	
I-1.1 - Linhagens bacterianas e plasmídios.....	43
I-1.2 - Cultivares de plantas.....	49
I-1.3 - Meios de cultura e antibióticos.....	49
I-1.4 - Testes de patogenicidade.....	51
I-1.4.1 -Descontaminação e germinação de sementes.....	51
I-1.4.2 -Teste em sementes.....	52
I-1.4.3 - Teste em plântulas.....	52
I-1.4.4. - Teste em hipocótilos.....	53
I-1.4.5- Teste em folhas.....	53

I-1.5 - Manipulação de DNA.....	54
I-1.5.1 -Extração de plasmídios em pequena e média escala.....	54
I-1.5.2 - Extração de DNA cromossômico.....	54
I-1.5.3 - Digestão de DNA com enzimas de restrição.....	54
I-1.5.4 - Transformação de <i>X. campestris</i> .....	55
I-1.5.5 - Isolamento de fragmento de DNA de gel e ligação a vetores plasmidiais.....	55
I-1.5.6 - Hibridização.....	56
I-1.5.7 - Deleção unidirecional e sequenciamento dos clones.....	56
I-1.5.7.1 - Reação de sequenciamento.....	57
I-1.5.7.2 - Gel de sequenciamento.....	57
I-1.5.7.2.1 - Tratamento das placas.....	57
I-1.5.7.2.2 - Preparação do gel.....	58
I-1.5.7.2.3 - Fixação do gel.....	59
I-1.5.7.3 - Análise de sequência de DNA.....	59
I-1.5.8 - Padrão de proteínas totais.....	59
I-1.5.8.1 - Extração de proteínas totais.....	59
I-1.5.8.2 - Gel de proteínas.....	60
 <b>I-2 -Resultados</b>	
I-2.1 - Seleção do clone 289Nal <sup>f</sup> /73.....	63
I-2.2 - Caracterização do clone 289Nal <sup>f</sup> /73.....	64
I-2.2.1 -Patogenicidade em hospedeiros de <i>X. campestris</i> pv. vesicatoria.....	64
I-2.2.1.1 - Teste em tomate.....	64
I-2.2.1.2 -Teste em pimentão.....	69
I-2.2.2 - Indução de hipersensibilidade em planta não hospedeira.....	71
I-2.2.3 - Patogenicidade em feijão e mandioca.....	71
I-2.3 - Caracterização do plasmídio pVM73 em outros patovares de <i>X. campestris</i> .....	73

I-2.4 - Hibridização de DNA de diferentes patovares de <i>Xanthomonas</i> e <i>Pseudomonas</i> com o fragmento <i>EcoRI</i> de 2.2 kb.....	78
I-2.5 - Deleção unidirecional do pK73 e sequenciamento.....	80
I-2.6 - Perfil de proteínas totais.....	81
I-3 - <b>Discussão</b> .....	88

**Parte II - Isolamento e caracterização de mutantes não patogênicos de *X. campestris* pv. *vesicatoria* utilizando-se o transposon Tn5**

<b>Revisão de literatura</b> .....	94
<b>II-1 -Material e métodos</b> .....	97
II-1.1 -Linhagens bacterianas e plasmídios.....	99
II-1.2- Cultivares de plantas.....	99
II-1.3 - Meios de cultura e antibióticos.....	99
II-1.4 - Mutagênese de <i>Xanthomonas</i> com transposon Tn5.....	100
II-1.5 - Seleção e caracterização de mutantes não patogênicos.....	101
II-1.5.1 - Produção de enzimas extracelulares.....	103
II-1.5.2 - Crescimento em meio mínimo (teste de prototrofia).....	103
II-1.5.3 - Curva de crescimento .....	104
II-1.6 - Perfil plasmidial da linhagem selvagem e dos mutantes.....	104
II-1.7 - Construção de banco de plasmídio .....	104
II-1.8 - Complementação de mutantes não patogênicos com banco de plasmídio.....	106
<b>II-2 - Resultados</b> .....	
II-2.1 - Isolamento de mutantes não patogênicos.....	107
II-2.2 - Caracterização dos mutantes não patogênicos.....	108
II-2.2.1 - Indução de hipersensibilidade em folhas de tabaco.....	108
II-2.2.2 - Produção de enzimas extracelulares.....	108
II-2.2.3 - Crescimento em meio mínimo.....	108

II-2.2.4 - Crescimento em meio completo.....	108
II-2.2.5 - Patogenicidade em pimentão.....	109
II-2.2.5.1 - Teste em sementes.....	109
II-2.2.5.2 - Teste em plântulas.....	109
II-2.2.5.3 - Teste em folhas.....	109
II-2.2.6 - Patogenicidade em tomate.....	112
II-2.2.6.1 - Teste em sementes.....	112
II-2.2.6.2 - Em folhas.....	113
II-2.3 - Isolamento de mutante espontâneo não patogênico.....	116
II-2.4 - Perfil plasmidial da linhagem selvagem e dos mutantes não patogênicos.....	116
II-2.5 - Construção de banco do plasmídio de 31 kb da linhagem 479Naf.....	118
<b>II-3 - Discussão</b>	119
<b>Literatura citada.....</b>	122

## Caracterização de um clone *hsv* e obtenção de mutantes não patogênicos de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

### RESUMO

Através da mobilização de um banco genômico de uma linhagem de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, patogênica para tomate, para uma linhagem de *X. campestris* pv. *manihotis*, que apresenta mandioca como hospedeiro, foram selecionados quatro clones capazes de reconhecer ambos os hospedeiros (Marques, 1992). Dando continuidade a este trabalho caracterizou-se estes clones através de testes de patogenicidade em tomate e um deles, 289Nal<sup>f</sup>/73, foi selecionado por apresentar-se mais virulento neste hospedeiro. Este clone que apresentou um inserto *EcoRI* de 2.2 kb foi analisado mais detalhadamente quanto ao possível envolvimento de genes de especificidade de hospedeiros (genes *hsv*) através de testes de patogenicidade em plantas hospedeiras e não hospedeiras, perfil de proteínas e sequenciamento. O clone 289Nal<sup>f</sup>/73, compatível com tomate foi testado em mandioca e tabaco (não hospedeiro) e não apresentou diferença da linhagem 289Nal<sup>f</sup> mostrando que genes *hrp* (de patogenicidade em plantas hospedeiras e de hipersensibilidade em plantas não hospedeiras) não estão presentes no plasmídeo pVM73 do clone 289Nal<sup>f</sup>/73. Para testar possível envolvimento de genes específicos de patogenicidade (genes *dsp*) e superexpressão destes genes, o plasmídeo pVM73 foi introduzido nas linhagens *X. campestris* pv. *phaseoli* 558 e *X. campestris* pv. *manihotis* 289Nal<sup>f</sup>. Os novos recombinantes foram testados em seus respectivos hospedeiros e não foi verificada virulência mais acentuada nas linhagens contendo o plasmídeo pVM73. O plasmídeo pVM73 também foi transferido para a linhagem *X. campestris* pv. *glycines* 333 e *X. campestris* pv. *citri* 223 a fim de avaliar o seu comportamento nestas linhagens incompatíveis com tomate. Observou-se que estas linhagens passaram a apresentar uma resposta de patogenicidade atípica neste hospedeiro. A partir destes resultados conclui-se que genes de reconhecimento de tomate como hospedeiro estejam possivelmente presentes no inserto *EcoRI* de 2.2 kb.

DNAs genômicos de diferentes patovares de *X. campestris* e *Pseudomonas chicorii* 1053, digeridos com *EcoRI*, foram hibridizados com o inserto *EcoRI* de 2.2 kb do plasmídeo pVM73. As linhagens de *X. campestris* apresentaram homologia em graus variáveis e bandas polimórficas indicando que estas sequências devem também estar presentes em outros patovares. Não foi detectada homologia com *P. chicorii*.

O inserto *EcoRI* de 2.2 kb foi completamente sequenciado e a análise da sequência apresentou dois quadros de leitura. Um deles apresentou homologia com genes *xpsE* e *pefE*, ambos de *X. campestris*, envolvidos na secreção de proteínas relacionadas com a patogenicidade; o outro quadro de leitura apresentou homologia com genes *bvgS* de *Bordetella parapertussis* e *B. bronchiseptica*, envolvidos na regulação de transcrição de fatores de virulência. Estes resultados sugerem que o gene *hsv* apresente alguma função relacionada com sistema de secreção ou que esteja envolvido na regulação de expressão de outros genes de patogenicidade.

O perfil de proteínas totais das linhagens 289Nal<sup>r</sup> e 289Nal<sup>r</sup>/73 apresentou-se semelhante, indicando que o gene *hsv* não se expressa ou se expressa fracamente no meio de cultura utilizado.

Outro trabalho conduzido paralelamente foi a obtenção de mutantes não patogênicos de *X. campestris* pv. vesicatoria e a caracterização dos mesmos. Estes mutantes podem ser utilizados para isolamento de genes de patogenicidade através de complementação com o banco genômico da linhagem selvagem. Foram obtidos 11 mutantes (2.5%) a partir da mutagênese da linhagem *X. campestris* pv. vesicatoria 479Nal<sup>r</sup> com o transposon Tn5. Esta linhagem é patogênica para tomate e pimentão. Os mutantes foram caracterizados através de diferentes testes de patogenicidade em tomate e pimentão, testes de hipersensibilidade em tabaco, testes de prototrofia, curva de crescimento, produção de enzimas extracelulares e perfil plasmidial. Foram obtidas diferentes classes de mutantes não patogênicos. Uma delas formada pelos mutantes Mut3, Mut7 e Mut9, foram não patogênicos para tomate e patogênicos para pimentão. Os demais mutantes foram não patogênicos para ambos os

hospedeiros. O Mut2 mostrou-se auxotrófico e de coloração branca, diferindo da linhagem selvagem e dos demais mutantes amarelos. Dentre os onze mutantes, apenas os mutantes Mut3, Mut4, Mut10 e Mut11 não produziram pectinase. As demais enzimas (celulase, protease e amilase) foram produzidas por todos os mutantes. Em meio completo, todos os mutantes apresentaram crescimento semelhante ao da linhagem selvagem, indicando o não envolvimento da “velocidade” de crescimento com a patogenicidade. Quanto ao perfil plasmidial, todos os mutantes não apresentaram plasmídios enquanto a linhagem selvagem apresentou 2: um de 31 kb e outro de 1.3 kb. Um banco de plasmídios da linhagem selvagem utilizado para testes de complementação dos mutantes não restaurou as características de patogenicidade dos mutantes.

## SUMMARY

By mobilization of a genomic library from a strain of *X. campestris* pv. *vesicatoria* (pathogenic to tomato) to a strain of *X. campestris* pv. *manihotis* (pathogenic to manioc) four clones able to recognize both the hosts were isolated (Marques, 1992). These clones were characterized by pathogenicity tests in tomato and the most virulent (289Nal<sup>f</sup>/73) was selected. This clone, harboring a 2.2 kb *EcoRI* fragment, was analysed by several pathogenicity tests in host and non-host plants, hybridization, total protein profile and sequencing experiments. The 289Nal<sup>f</sup>/73 strain compatible to tomato, was tested in manioc and tobacco (nonhost) and it did not show any differences compared to the wild type strain (289Nal<sup>f</sup>) showing that genes *hrp* (Hypersensitivity response and pathogenicity) were not involved in the 2.2 kb *EcoRI* fragment.

The pVM73 (pUFR027+2.2 kb *EcoRI* insert) was transferred to different pathovars of *X. campestris* and different pathogenicity tests were performed. To test the possibility of involvement of *dsp* genes (disease specific) and overexpression of these genes, the *X. campestris* pv. *phaseoli* 558/73 and *X. campestris* pv. *manihotis* 289Nal<sup>f</sup>/73 strains were tested in their hosts and they did not present altered symptoms of the disease. Also *X. campestris* pv. *glycines* 333/73, *X. campestris* pv. *citri* 223/73 and *X. campestris* pv. *phaseoli* 558/73 were used in compatibility tests in relation to tomato plants. The *X. campestris* pv. *glycines* 333/73 and *X. campestris* pv. *citri* 223/73 strains presented an atypical response of pathogenicity in tomato indicating a low level of recognition of this host. The strain *X. campestris* pv. *phaseoli* 558/73 did not show any pathogenicity response. Concerning these results it was concluded that a gene responsible for recognition of tomato as a host in the 2.2 kb *EcoRI* insert was cloned.

Total DNA of different pathovars of *X. campestris* and *Pseudomonas chicorii* 1053 digested with *EcoRI* were hybridized with the 2.2 kb *EcoRI* insert. The *X. campestris* strains

presented variable homology and polymorphic bands showing that these sequences occurs in other pathovars but not in *P. chicorii*.

The 2.2 kb *EcoRI* insert was sequenced and the analysis of the sequence showed two open reading frames (ORF1 and ORF2). ORF1 presented homology with the *xpsE* and *pefE* genes, both involved in the secretion of proteins related with pathogenicity in *X. campestris*. The ORF2 showed homology to *bvgS* gene from *Bordetella parapertussis* and *B. bronchiseptica* related to the transcriptional regulation of the virulence factors. These results suggest that *hsv* gene presents some related function either to the secretion system or in the regulation of pathogenicity genes.

The whole cell protein profile of the 289Nal<sup>r</sup> and 289Nal<sup>r</sup>/73 strains was similar showing that there was a low or no expression of the *hsv* gene in the culture medium.

In the second chapter non-pathogenic mutants of *X. campestris* pv. *vesicatoria* were isolated and characterized. Eleven mutants were obtained (2.5%) by the Tn5 mutagenesis of the *X. campestris* pv. *vesicatoria* 479Nal<sup>r</sup> strain (pathogenic to tomato and pepper). These mutants were characterized by different pathogenicity tests in tomato and pepper, hypersensitivity tests in tobacco, prototrophy test, growth curve, production of extracellular enzymes and plasmid profile. Two different classes of mutants were obtained. One of them, composed by the mutants Mut3, Mut7 e Mut9 were non pathogenic to tomato and pathogenic to pepper. The second group, was non-pathogenic to both plant species. The Mut2 was auxotrophic and the colony was white, whereas colonies of the wild type and the other mutants were prototrophic and yellow. The production of extracellular amylase, protease and cellulase were detected in all mutants except for pectinase wich was not produced by Mut3, Mut4, Mut10 and Mut11. All mutants lacked plasmids while the wild type strain exhibited two plasmids: one of 31 kb and another of 1.3 kb. A plasmid library from the wild type strain did not complement the pathogenicity phenotype of the mutants.

## ABREVIACOES

EDTA	cido etilenodiaminotetracético
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactoside
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
Km	canamicina
Sp	espectinomicina
Amp	amppicilina
Gm	gentamicina
Nal	cido nalidíxico
Sm	estreptomocina
CIP	“calf Intestinal Phosphatase”
pb	pares de base
kb	mil pares de bases
rpm	rotaes por minuto
kV	quilovolts
V	volts

## INTRODUÇÃO

Os principais grupos de patógenos de planta são constituídos por vírus, fungos e bactérias. As bactérias geralmente oferecem maiores prejuízos para a agricultura de regiões úmidas e quentes (regiões tropicais e equatoriais) onde encontram condições climáticas favoráveis ao seu desenvolvimento (Daniels, 1989).

As bactérias fitopatogênicas estão agrupadas em um pequeno número de gêneros e entre eles está o grupo *Xanthomonas campestris*. Esta espécie apresenta mais de 143 patovares distinguíveis apenas pela planta hospedeira (Bradbury, 1984; Vauterin *et al.*, 1990). *X. campestris* pv. *vesicatoria* é o agente causador da mancha bacteriana em tomate e pimentão. Embora a doença seja conhecida há várias décadas ainda permanecem inúmeras questões não esclarecidas acerca da interação planta-patógeno.

Um dos grandes objetivos no estudo da interação planta-bactéria é a elucidação do mecanismo básico do parasitismo e dos mecanismos da doença. Tais processos são bem conhecidos em bactérias patogênicas para animais, no entanto, em relação às bactérias fitopatogênicas muitas questões ainda são obscuras (Daniels *et al.*, 1988). Na tentativa de elucidar os processos da interação entre bactérias fitopatogênicas e plantas, diversas áreas de pesquisas vêm sendo desenvolvidas, entre elas a identificação e expressão de genes de patogenicidade, natureza e função de seus produtos, determinação de mecanismos envolvidos na especificidade de hospedeiros, indução de reação de defesa de plantas e aplicação de bactérias geneticamente modificadas no controle de doença de plantas (Chatterjee, 1978). Nos últimos anos com o desenvolvimento de técnicas de Biologia Molecular, muito progresso tem sido obtido na elucidação desta interação. Vários genes já foram clonados incluindo genes para a produção de enzimas extracelulares (Tang *et al.*, 1987; Dow *et al.*, 1987; Gough *et al.*, 1988; Hu *et al.*, 1992), genes para a produção de exopolissacarídeos (Barrère *et al.*, 1986; Harding *et al.*, 1987 e Thorne *et al.*, 1987), genes de avirulência (Swanson *et al.*, 1988; Ronald & Staskawicz, 1988), resistência à cobre (Stall *et al.*, 1986), genes de patogenicidade (Willis *et al.*, 1991; Kamoun & Kado, 1990;

Bonas *et al.*, 1991; Schulte & Bonas, 1992; Seal *et al.*, 1990) e genes de especificidade de hospedeiro (Melano & Cooksey, 1988). Porém, os papéis de muitos desses genes ainda são incertos e outros deverão ainda ser descritos.

O entendimento do processo é fundamental para que se possa intervir de maneira racional na patogenicidade deste microrganismo.

*Xanthomonas* é um gênero de bactérias Gram-negativas e como as demais bactérias desta classe são excelentes modelos para a manipulação gênica (Chatterjee & Vidaver, 1986). Uma das estratégias de genética de fitopatogenicidade bacteriana muito difundida é a obtenção de mutantes não patogênicos seguida de complementação com DNA da linhagem selvagem. Estes mutantes podem ser obtidos com o uso de mutagênicos químicos, físicos ou elementos de transposição. Dentre esses últimos, o mais comumente usado é o Tn5 (Daniels, 1989). O transposon Tn5 possui 5700 pares de bases e possui um gene de resistência ao antibiótico canamicina. O uso de transposons oferece vantagens em relação aos demais agentes mutagênicos uma vez que pode ser usado como marcador físico e genético em bactérias fitopatogênicas (Staskawicz *et al.*, 1987; Tang *et al.*, 1987; Turner *et al.*, 1984; Anderson & Mills, 1985; Shaw *et al.*, 1988; Swarup *et al.*, 1991 e Mills, 1985).

Um dos objetivos do presente trabalho foi dar continuidade ao trabalho de Marques (1992) que mobilizou um banco genômico de uma linhagem de *X. campestris* pv. vesicatoria, patogênica para tomate, para uma linhagem de *X. campestris* pv. manihotis que apresenta mandioca como hospedeiro. Foram isolados quatro clones capazes de reconhecer ambos os hospedeiros. O presente trabalho caracterizou estes clones quanto à patogenicidade e um deles foi analisado mais detalhadamente quanto ao possível envolvimento de genes de especificidade de hospedeiros (genes *hsv*) através de caracterização por meio de testes de patogenicidade, perfil de proteínas e sequenciamento.

Outro objetivo do presente trabalho foi a obtenção de mutantes não patogênicos de *X. campestris* pv. vesicatoria utilizando-se o transposon Tn5 e a caracterização destes através de testes de patogenicidade, produção de enzimas extracelulares, caracterização

auxotrófica e perfil plasmidial. Tais mutantes apresentam um grande potencial uma vez que podem ser usados em testes de complementação com banco genômico permitindo que genes de patogenicidade sejam isolados.

## **Parte 1**

### **Caracterização de um gene *hsv* de *X. campestris* pv. *vesicatoria***

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1 - Bactérias Fitopatogênicas

As bactérias fitopatogênicas estão incluídas em um número pequeno de gêneros (Daniels, 1989). As Gram-positivas fitopatogênicas são pertencentes aos gêneros *Clavibacter* (causam cancos e murchas), *Curtobacterium* (causadoras de murchas) e *Rhodobacterium* (causam hipertrofias). As bactérias Gram-negativas fitopatogênicas pertencem aos gêneros *Agrobacterium* (agente causador de galhas - hipertrofias), *Erwinia* (causam necroses, murchas e podridão), *Pseudomonas* (manchas foliares, hipertrofia e murchas) e *Xanthomonas* (causam manchas bacterianas em folhas e frutos e necroses).

#### 1.1 - *Xanthomonas campestris*

Bactérias do gênero *Xanthomonas* pertencem à família das Pseudomonadaceae e são Gram-negativas. Apresentam na maioria dos casos coloração amarela em meio de cultura devido à produção de um pigmento denominado xantomonadina, característico dessa bactéria. São móveis, apresentando flagelo polar e aeróbicas (Agrios, 1988).

Quase todos os membros do gênero *Xanthomonas* apresentam associações com plantas e são encontrados praticamente no mundo todo (Bradbury, 1984). Membros deste gênero causam lesões necróticas em folhas, caules e frutos, murchas, maceração de tecidos (raízes), e hiperplasias (como o cancro cítrico) em pelo menos 124 monocotiledôneas e 268 espécies de dicotiledôneas incluindo importantes espécies de valor comercial como arroz, feijão, mandioca, algodão, tomate, trigo, crucíferas e cítricos (Leyns *et al.*, 1984). Linhagens individuais atacam um número limitado de hospedeiros e são agrupadas em patovares de acordo com a planta da qual a bactéria foi isolada (Chen *et al.*, 1994). Oito espécies de *Xanthomonas* já foram descritas e entre elas está *X. campestris*. É o gênero mais complexo e está subdividido em mais de 143 patovares (Vauterin *et al.*, 1990; Bradbury, 1984). Uma nova classificação para o gênero *Xanthomonas* com base em estudos

de hibridização DNA-DNA foi proposta recentemente por Vauterin *et al.* (1995). Nestes estudos os autores propõem que o gênero *Xanthomonas* seja dividido em 21 espécies.

#### 1.1.1 - *X. campestris* pv. *vesicatoria*

*X. campestris* pv. *vesicatoria* é o agente causador da mancha bacteriana em tomate e pimentão. Em interação compatível, após ter invadido a planta via estômatos ou lesões, a bactéria se multiplica nos espaços intercelulares do tecido provocando lesões necróticas úmidas (Bonas *et al.*, 1993). Esta bactéria causa grandes prejuízos econômicos devido ao baixo rendimento e qualidade dos frutos, sendo que os danos mais graves são apresentados em regiões de umidade relativa alta, chuvas prolongadas e temperatura próxima de 24<sup>0</sup>C (Alippi, 1992).

Este patógeno pode ser dividido em três grupos baseando-se na sua virulência em plantas de pimentão e tomate (Cook & Stall, 1969). XcvT, grupo virulento somente para tomate, XcvP, virulento somente para pimentão e XcvPT, virulenta para ambos os hospedeiros, tomate e pimentão.

Ultimamente a divisão mais aceita desse patovar é realizada de acordo com outras características além da patogenicidade: atividade amilolítica, atividade pectolítica e presença de determinadas bandas de proteínas. Estas características tornam possível o reconhecimento de dois grupos distintos dentro do patovar *X. campestris* pv. *vesicatoria*: o grupo A e o grupo B (Bouzar *et al.*, 1993). Stall *et al.* (1994) e Bouzar *et al.* (1994) comprovaram estes dados através de análise de utilização de fontes de carbono, serologia, perfil de ácidos graxos, sítios de enzimas de restrição e de bandas de proteínas. O Grupo A

de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, não produtor de amilase e pectinase, apresenta uma banda de proteína de 32 kDa (banda  $\alpha$ ) e não possui banda de 27 kDa (banda  $\beta$ ) enquanto o grupo B, produtor de amilase e pectinase, possui a banda  $\beta$  e não possui a banda  $\alpha$  (Bouzar *et al.*, 1993). Estudos de homologia entre DNA de linhagens do grupo A e B revelou uma baixa homologia demonstrando diferenças genéticas entre eles (Stall *et al.*, 1994).

Vauterin *et al.* (1995) propõem que *X. campestris* pv. *vesicatoria* seja dividido em dois grupos. O antigo subgrupo de *X. campestris* pv. *vesicatoria* grupo A passaria a pertencer ao grupo *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e o grupo antigo de *X. campestris* pv. *vesicatoria* grupo B passaria a se chamar *X. vesicatoria*.

## 1.2 - Fatores gerais envolvidos na patogenicidade

Diversos fatores estão envolvidos na interação de bactérias fitopatogênicas com plantas. São exemplos: a produção de enzimas extracelulares, produção de exopolissacarídeos, produção de substâncias químicas (toxinas e hormônios), fatores físicos (temperatura, luz, umidade, etc.) e produtos de alguns genes da planta e do patógeno (Daniels, 1984b; Alippi, 1992; Agrios, 1988).

Bactérias fitopatogênicas produzem várias enzimas extracelulares que podem degradar compostos do hospedeiro, tais como: pectinase, celulase, protease, amilase e fosfolipases (Daniels, 1988). A importância destas enzimas na patogenicidade varia de acordo com a espécie. Para *X. campestris* pv. *campestris* Dow *et al.* (1989) e Tang *et al.* (1987) relataram que protease, celulase e pectinase não têm papel direto na patogenicidade. Porém, sabe-se que a produção destas enzimas extracelulares são fundamentais para a

patogenicidade de outra bactéria fitopatogênica, *Erwinia amylovora* (Kotoujansky, 1987). Enzimas proteolíticas e pectinolíticas produzidas e secretadas por *X. campestris* pv. *campestris* estão envolvidas na destruição de tecidos da planta (Daniels *et al.*, 1987), mas estas mesmas enzimas também são produzidas por um grande número de bactérias associadas com plantas, incluindo saprófitas (Collmer *et al.*, 1982; Perombelon, 1982). Em *Xanthomonas*, mutantes com alteração na produção destas enzimas apresentaram virulência atenuada indicando que enzimas degradativas sozinhas não são suficientes para causar doença mas que podem participar desta resposta na planta.

O papel dos polissacarídeos produzidos por bactérias ainda não está bem esclarecido. Em *Xanthomonas* a relação da produção de goma xantana (exopolissacarídeo produzido por este gênero) e patogenicidade ainda não é bem entendida (Barrère *et al.*, 1986; Daniels, 1988; Ramirez *et al.*, 1988). Para outro gênero de bactérias fitopatogênicas, *Pseudomonas*, o exopolissacarídeo (EPS) parece ser importante na patogenicidade. Neste gênero já foi demonstrado que EPS purificado induz alguns sintomas de doença (Kao *et al.*, 1992). Em *Erwinia* a produção de EPS tem mostrado ter papel também na virulência (Bennett & Billing, 1978; Belleman & Geider, 1992).

A produção de toxinas também pode ser um fator importante para a patogenicidade. Compostos produzidos que são tóxicos para plantas são denominados fitotoxinas. Estas toxinas são produzidas por bactérias e fungos. Como exemplo de fitotoxinas temos a tabtoxina e a faseolotoxina. A tabtoxina é produzida por *P. tabaci* e é responsável pelo fogo selvagem em tabaco. A faseolotoxina é produzida por *P. phaseolicola* e causa o crestamento bacteriano em feijão. Tais compostos são efetivamente importantes para a

patogenicidade destes microrganismos (Agrios, 1988) e mutantes para a produção de toxinas apresenta a virulência reduzida como é o caso de *P. syringae* pv. *syringae* que produz toxinas chamadas siringomicina e siringotoxina (Morgan & Chatterjee, 1985).

Além desses fatores descritos acima, existem outros da planta e do patógeno que estão envolvidos tanto na compatibilidade (doença) como na incompatibilidade (avirulência).

### **1.2.1 - Genes de patogenicidade**

A interação entre bactérias fitopatogênicas e suas plantas hospedeiras é bastante complexa e seus mecanismos não são bem conhecidos. Vários genes, tanto do patógeno quanto da planta, estão envolvidos nesta interação. Estes genes podem ter diversas funções, tais como possibilitar o reconhecimento da planta e facilitar a colonização do tecido hospedeiro. Os genes bacterianos relacionados com a patogenicidade podem ser classificados em dois grandes grupos: genes envolvidos no controle de especificidade raça-cultivar (Staskawicz *et al.*, 1984) e genes requeridos para compatibilidade básica (Ellingboe, 1982).

No primeiro grupo, de genes de incompatibilidade envolvidos na especificidade raça-cultivar, encontram-se os genes *avr*, de avirulência, descritos em *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Erwinia* e *Agrobacterium*.

Os genes *avr* (“avirulence”) são genes que restringem o número de hospedeiros do patógeno. Os produtos destes genes podem interagir num modelo de interação “gene-a - gene” com produtos de genes de resistência da planta hospedeira. Dessa interação resulta a incompatibilidade e o patógeno não consegue colonizar o tecido da planta, isto é, o gene *avr* confere ao patógeno o fenótipo avirulento em plantas que possuem o gene de resistência correspondente. Para um gene *avr* específico há um de resistência *R* específico da planta. Nesta interação incompatível, moléculas sinais (elicitoras) são produzidas pelo patógeno

(codificadas direta ou indiretamente pelos genes *avr*) e reconhecidas por receptores do hospedeiro (codificados pelos genes de resistência). Desta interação têm-se a ativação de genes em cascata que levam à reação de hipersensibilidade (HR, do inglês Hypersensitive response ). Esta reação apresentada pela planta caracteriza-se pela morte do tecido vegetal em torno da região infectada pelo patógeno e produção de compostos químicos inibidores de crescimento bacteriano (Staskawicz *et al.*, 1995; Lamb *et al.*, 1989). A HR é induzida por vários gêneros de bactérias fitopatogênicas incluindo *Pseudomonas*, *Xanthomonas* e *E. amylovora* (Hildebrand & Riddle, 1971). Uma resposta HR pode ser induzida em duas situações: caso a planta hospedeira invadida pelo patógeno seja resistente, isto é, apresente genes de resistência (envolvimento de genes *avr*) ou caso a planta invadida não seja hospedeira do patógeno, neste caso ocorre envolvimento de genes da classe *hrp* que serão descritos posteriormente.

No segundo grupo, de genes de compatibilidade básica entre o patógeno e seu hospedeiro, encontramos quatro classes de genes: *dsp* (“disease specific”); *hrp* (“hypersensitive response and pathogenicity”); *hsv* (“host-specific virulence”) e *hrm* (“hypersensitive response modulation”). Os dois primeiros são descritos em *Xanthomonas*, *Pseudomonas* e *Erwinia*. Genes *hsv* foram descritos em *Pseudomonas* e *Xanthomonas* e *hrm* em *Pseudomonas* e *Erwinia*.

Os genes *dsp* são específicos de doença. Só apresentam envolvimento com a resposta de patogenicidade, não desempenhando papel algum na elicitação de resposta de hipersensibilidade e no reconhecimento de hospedeiros. Mutantes *dsp*<sup>-</sup> são incompatíveis com todos os seus hospedeiros e induzem HR em não hospedeiros (Seal *et al.*, 1990). São genes ainda muito pouco conhecidos.

Genes *hrp* são responsáveis pela elicitação de resposta de hipersensibilidade em plantas não hospedeiras e de patogenicidade em plantas hospedeiras não resistentes. Geralmente estão organizados em “cluster” onde vários genes estão envolvidos com esta resposta. Os mutantes *hrp*<sup>-</sup>, além de não serem patogênicos para seus hospedeiros sensíveis

não são capazes de induzir HR em plantas não hospedeiras. Os genes *hrp* são bastante descritos em relação aos genes *dsp* e *hsv* e seus papéis começam a ser desvendados (Willis *et al.*, 1991).

A classe de genes *hrm*, envolvida na modulação da expressão dos genes *hrp*, ainda é muito pouco conhecida e está geralmente agrupada com os genes *hrp*.

Uma outra classe de genes de compatibilidade básica é a de genes *hsv*, de especificidade de hospedeiros. Estes genes conferem ao patógeno a característica de reconhecer determinada planta como sendo hospedeira. São muito poucos os genes desta classe descritos e nada se sabe ainda a respeito de seu produto, expressão e como age para conferir esta característica de reconhecimento.

#### **1.2.1.1 - Genes de avirulência - *avr* (“avirulence”)**

A reação de incompatibilidade entre uma planta hospedeira e um determinado patógeno envolve fatores de ambos os organismos. A planta é dita resistente quando apresenta um gene de resistência específico para um gene de avirulência do patógeno. Quando um patógeno possui um gene de avirulência *avrX* (hipotético) e infecta uma planta hospedeira com um gene de resistência *RX* (hipotético), ocorre uma interação “gene-a-gene” e dessa resulta uma reação de defesa da planta denominada reação de hipersensibilidade (já descrita anteriormente). Linhagens de patógeno que apresentam os mesmos genes *avr* são agrupados em raças (Staskawicz *et al.*, 1984).

Staskawicz *et al.* (1984) construíram um banco genômico de uma linhagem de *P. syringae* pv. *glycinea* da raça 6, incompatível com o cultivar Harosoy & Peking de soja, e mobilizaram esse banco para uma outra raça deste mesmo patovar (raça 5). Puderam então selecionar um recombinante Psg5 (pPg613) que se tornou incompatível com o cultivar Harosoy & Peking de soja (característica da raça 6) e manteve a incompatibilidade comum da raça 5. O plasmídeo deste recombinante, pPg613 (inserto de 27.2 kb), foi transferido para

duas outras raças, 1 e 4, e estas passaram a apresentar fenótipo de raças 1 e 6, 4 e 6, respectivamente. Estava claro que algum fator que conferia incompatibilidade com o cultivar Harosoy & Peking de soja estava presente neste plasmídeo pPg613. Mapeamento por enzimas de restrição e mutagênese com transposon Tn5 deste plasmídeo determinou o gene de avirulência num fragmento de 1.4 kb. Este gene, *avrA*, não foi encontrado nas raças 1, 4 e 5 através de hibridização. O plasmídeo pPg613 foi introduzido em *E. coli*, *P. fluorescens* (saprófita) e em *Rhizobium japonicum*, porém, nenhuma dessas bactérias foi capaz de induzir resposta de hipersensibilidade em folhas de soja.

De maneira similar, genes *avr* foram clonados de outras raças de *P. syringae* pv. *glycinea* (Staskawicz *et al.*, 1987), de *X. campestris* pv. *malvacearum* (Gabriel *et al.*, 1986) e de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Swanson *et al.*, 1988). Staskawicz *et al.* (1988) observaram que o gene *avrB* de *P. syringae* pv. *glycinea* pode sofrer repressão catabólica e é regulado por fatores nutricionais e sinais da planta. Este gene do patógeno se expressou na planta, tanto em interações compatíveis quanto incompatíveis. Para a expressão do gene *avrB* em alto nível é necessária uma região de 2 kb do locus *hrp* deste patógeno demonstrando que os genes *avr* devem sofrer regulação por outros genes da bactéria. Os polipeptídeos dos genes *avrA*, *avrB* e *avrC* de *P. syringae* pv. *glycinea* não apresentam homologia com outras proteínas conhecidas, são hidrofílicos e não contêm peptídeo sinal ou outra estrutura que sugira que sejam processados na membrana da bactéria (Napoli & Staskawicz, 1987; Staskawicz *et al.*, 1988).

No gênero *Xanthomonas*, já foram descritos inúmeros genes *avr*. No patovar *X. campestris* pv. *malvacearum*, patógeno de algodão, DeFeyter & Gabriel (1991) localizaram seis genes de avirulência em um plasmídeo de 90 kb (*avrB4*, *avrB6*, *avrB7*, *avrBIn*, *avrB101* e *avrB102*).

*X. campestris* pv. *vesicatoria*, patógeno de tomate e pimentão é o patovar melhor caracterizado. Este patovar pode ser dividido em três grupos: *XcvT*, formado por *X. campestris* pv. *vesicatoria* virulentas apenas para tomate; *XcvP*, virulentas apenas para

pimentão e *XcvPT*, virulentas para tomate e pimentão (Cook & Stall, 1969). Uma outra divisão também é feita neste patovar, a divisão em raças, como foi descrito por Staskawicz *et al.* (1984) para *Pseudomonas*. Foram caracterizadas diversas raças de acordo com os genes *avr* que o patógeno possui. Um resumo dos grupos e raças de *X. campestris* pv. vesicatoria é apresentado abaixo (Minsavage *et al.*, 1990):

Virulência de grupos e raças de *X. campestris* pv. vesicatoria classificados de acordo com a reação em tomate e pimentão

Grupo	Raça	Pimentão				Tomate
		ECW	ECW-10R (Bs1)	ECW-20R (Bs2)	ECW-30R (Bs3)	WALTER
Tomate (XcvT)	1	-	-	-	-	+
Pimentão (XcvP)	1	+	+	-	-	-
Pimentão -Tomate (XcvPT)	2	+	-	-	+	+
Pimentão -Tomate (XcvPT)	3	+	+	-	+	+

+ virulento

- avirulento

ECW- Early calwonder

ECW10R, 20R e 30R-ECW contendo genes de resistência Bs1, Bs2 e Bs3, respectivamente.

Stall *et al.* (1986) localizaram um gene de avirulência, *avrBs1*, em *X. campestris* pv. vesicatoria raça 2. Foi a primeira descrição de gene de avirulência em plasmídeo descrito em patógeno de planta. Tal gene encontra-se ligado a um gene de resistência a cobre num plasmídeo conjugativo de aproximadamente 193 kb. Transferiu-se o gene *avrBs1* por conjugação para *X. campestris* pv. vesicatoria raça 1 e esta passou a apresentar HR em pimentão cultivar ECW-10R (característica da raça 2). Dahlbeck & Stall (1979) encontraram neste gene de avirulência uma alta frequência de mutação ( $4 \times 10^{-4}$ ) que converte

o fenótipo do patógeno de raça 2 para raça 1. Kearney *et al.* (1988) localizaram neste plasmídeo sequências IS476 que criam homologia e poderiam promover recombinações levando a uma alta frequência de mutação.

Minsavage *et al.* (1990) construíram um banco genômico de uma linhagem *XcvT* que foi utilizado para complementar uma linhagem *XcvPT* virulenta para pimentão ECW e tomate e isolaram um gene, *avrBsT*, que tornou a linhagem *XcvPT* avirulenta para este cultivar de pimentão. Este gene *avrBsT* estava localizado num plasmídeo de aproximadamente 41 kb. Estes mesmos autores também clonaram o gene de avirulência *avrBs2* de *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Inocularam uma linhagem *XcvP* avirulenta em folhas de pimentão ECW20R (cultivar contendo o gene *Bs2* de resistência) e isolaram um mutante espontâneo *avrBs2<sup>v</sup>* (virulento para ECW20R). Este mutante foi complementado com um banco de *XcvT* e assim identificou-se um fragmento de 2.4 kb correspondente ao gene *avrBs2* localizado no DNA cromossomal. Kearney & Staskawicz (1990) descreveram uma ampla distribuição e conservação deste gene de avirulência ao longo de todas as raças de *X. campestris* pv. *vesicatoria* e de diferentes patovares de *X. campestris*. A homologia funcional destes *avr* de diferentes patovares foi comprovada através de complementação de *X. campestris* pv. *vesicatoria* *avrBs2<sup>v</sup>* com gene *avrBs2* de *X. campestris* pv. *alfalfae* e *X. campestris* pv. *phaseoli* tornando-a avirulenta. Tais autores também descreveram um envolvimento deste gene na virulência do patógeno em plantas suscetíveis. Para a bactéria *X. campestris* pv. *vesicatoria* ser virulenta, além de não poder ocorrer a interação “gene-a-gene” entre *avr* e gene de resistência, o gene *avrBs2* deve estar presente. Entretanto, esta dependência ainda não foi esclarecida.

Bonas *et al.* (1989) localizaram o gene *avrBs3* em um plasmídeo de uma linhagem de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (raça 1, grupo *XcvP*). Esta linhagem havia perdido simultaneamente a habilidade de induzir HR em cultivar ECW30R e um plasmídeo conjugativo de 45 kb. Não foi encontrada homologia deste gene em outras raças de *vesicatoria* e nem em *X. campestris* pv. *alfalfae*, *X. campestris* pv. *campestris* e *X.*

*campestris* pv. *malvacearum*. O fragmento de 3.7 kb que continha o gene *avrBs3* foi sequenciado e encontraram inúmeras sequências repetidas e invertidas de 102 pb neste gene. A sequência de nucleotídios e de aminoácidos codificados por este gene não apresentou homologia com os genes *avrBs1* e *avrBs2* e seus produtos, respectivamente (Ronald & Staskawicz, 1988), nem com *avrA*, *avrB* e *avrC* de *P. s.* pv. *glycinea* (Napoli & Staskawicz, 1987; Tamaki *et al.*, 1988). O gene *avrBs3* codifica uma proteína de 122 kDa e é transcrito constitutivamente em meio mínimo, complexo ou em planta. Foi demonstrado que sua expressão é independente de fatores da planta e de genes *hrp*, embora esses últimos sejam necessários para que linhagens de *X. campestris* pv. *vesicatoria* com gene *avrBs3* elicitam uma HR raça-específica em plantas com o gene *Bs3* (Knoop *et al.*, 1991). Experimentos utilizando anticorpo anti-proteína *avrBs3* foram elaborados e a proteína foi localizada no citoplasma da bactéria. Não se sabe ainda como esta proteína interage com o produto do gene *Bs3* (Knoop *et al.*, 1991).

Em 1991, Canteros *et al.* localizaram um gene *avr* de uma linhagem avirulenta em tomate e virulenta em pimentão (*XcvP*). O gene foi denominado *avrBsP* e confere avirulência em tomate. Tal gene hibridizou com o gene *avrBs3*. No entanto estes dois genes apresentam atividades biológicas distintas. Análise de suas sequências vieram confirmar a existência de pequenas diferenças entre eles. Estas diferenças foram encontradas em algumas bases da região repetida.

#### **1.2.1.2 -Genes de especificidade de hospedeiros: *hsv* (“host specific virulence”)**

Do gênero *Xanthomonas* apenas dois trabalhos relatam mutantes *hsv<sup>-</sup>* e em apenas um deles o gene responsável pela característica foi isolado.

Mellano & Cooksey (1988) foram os primeiros pesquisadores a sugerirem a existência de genes que permitiriam a esse patógeno reconhecer seu(s) hospedeiro(s). Tais autores trabalharam com *X. campestris* pv. *translucens*. Trata-se de um patógeno que

reconhece como hospedeiros várias plantas, no caso cereais (trigo, centeio, aveia e triticale). Através de mutações com transposon Tn5, os autores obtiveram dois mutantes com frequência de  $8 \times 10^{-4}$ , que deixaram de reconhecer determinados hospedeiros, e no entanto, mantiveram a capacidade de reconhecer os demais hospedeiros. Assim, o mutante Xct4.1 era não patogênico para centeio e o Xct4.5 deixou de reconhecer trigo. Através de mutagênese com EMS (Etil Metano Sulfonato), os autores também foram capazes de selecionar mutantes com a característica de reconhecimento de hospedeiros alterada. Foram selecionados três mutantes *hsv<sup>-</sup>*, com frequência de  $2 \times 10^{-3}$ , um dos quais apresentou reduzido nível de produção de EPS (exopolissacarídeo). Os autores não encontraram correlação entre a produção de EPS e o reconhecimento de hospedeiros visto que outros mutantes que produzem pouco EPS mantiveram-se virulentos para todos os hospedeiros. A capacidade destes mutantes em colonizar e apresentar sintomas de patogenicidade foi testada em todos os hospedeiros da linhagem selvagem. Não só foi realizada uma avaliação macroscópica da capacidade de induzir sintomas de patogenicidade em plântulas hospedeiras como também foram realizados experimentos onde se acompanhou a multiplicação das bactérias selvagem e mutantes nos hospedeiros. Assim foi possível determinar em plântulas de centeio, que o número de células do mutante Xct4.4 (EMS), manteve-se abaixo do número da linhagem selvagem que lhe deu origem. É interessante notar que mesmo não apresentando nenhuma resposta nas plântulas de centeio, o número de células Xct4.4 aumentou neste hospedeiro atingindo um máximo de  $10^{10}$  células/g de tecido, enquanto a linhagem selvagem atingiu um valor máximo próximo a  $10^{11}$ /g tecido.

A inativação da virulência em apenas um determinado membro da gama de hospedeiro sugere a existência de determinantes individuais para o reconhecimento de cada hospedeiro.

Mutantes que deixaram de reconhecer dois hospedeiros também puderam ser selecionados. Isto pode indicar que genes *hsv* para estes hospedeiros estão próximos e que uma única mutação poderia alterá-los ou ainda que possa existir um único gene responsável

pelo reconhecimento destes dois hospedeiros. Os autores sugerem neste trabalho que o fator para reconhecimento de hospedeiros possa ser um sinal químico ou estrutural produzido pela bactéria e reconhecido pela planta, ou o reconhecimento bacteriano de algum produto específico da planta hospedeira (Mellano & Cooksey, 1988).

No segundo trabalho de genes *hsv*, Waney *et al.* (1991) descreveram a obtenção de mutantes *hsv*<sup>-</sup> de *X. campestris* pv. *translucens* através de mutagênese com o transposon Tn5-GUS. Estes pesquisadores obtiveram mutantes *hsv*<sup>-</sup> para cevada, trigo, centeio, aveia e triticales numa frequência de  $7 \times 10^{-2}$ ,  $4 \times 10^{-2}$ ,  $11 \times 10^{-2}$ ,  $7 \times 10^{-2}$  e  $7 \times 10^{-2}$ , respectivamente. As regiões flanqueadoras do Tn5 de dois mutantes, *hsv*<sup>-</sup> W (para trigo) e *hsv*<sup>-</sup> B (para cevada), foram utilizadas como sonda para localizar clones homólogos num banco genômico da linhagem selvagem. Os clones obtidos (de 35 kb para *hsv*<sup>-</sup> W e 38 kb para *hsv*<sup>-</sup> B) foram utilizados para complementar e restaurar a característica de reconhecimento dos hospedeiros nos mutantes. Através de subclonagem, estes fragmentos de 35 e 38 kb puderam ser restringidos para fragmentos menores de 15.6 kb e 11.4 kb, respectivamente. Estes fragmentos menores foram introduzidos nos mutantes e a complementação foi avaliada através de curva de crescimento destes mutantes complementados nos hospedeiros para a qual se esperava a uma compatibilidade. A complementação foi um sucesso e o crescimento bacteriano dos mutantes no tecido da planta hospedeira foi semelhante ao da linhagem selvagem. Uma vez que diferentes loci foram inativados dando alterações de reconhecimento de diferentes plantas, os autores sugerem que hajam genes *hsv* específicos para cada planta hospedeira. Os genes *hsv* agem de maneira positiva, isto é, sua presença aumenta o número de hospedeiros para a bactéria, enquanto os genes *avr*, como já foi visto anteriormente, restringem o número de hospedeiros.

Até o presente momento não se tem conhecimento de trabalhos publicados sobre genes *hsv* de *Xanthomonas* e nem continuação destes dois trabalhos acima descritos. Também não há ainda uma melhor caracterização destes genes com relação ao mecanismo de ação, estrutura, expressão e regulação.

Os loci *hsv* de *X. campestris* pv. *translucens* e outros loci de funções similares de *P. syringae* (Salch & Saw, 1988) e *P. solanacearum* (Ma *et al.*, 1988) podem representar uma classe distinta de genes responsáveis pelo reconhecimento a nível de gênero e talvez a nível de espécies de plantas hospedeiras. Podem também ser análogos funcionais dos genes *hsn* (“host-specific nodulation”) de *Rhizobium*. Neste microrganismo foram descritos genes que determinam a gama de hospedeiros, os genes *hsn* (Downie *et al.*, 1983; Hombrecher *et al.*, 1984; Schofield *et al.*, 1984; Kondorosi *et al.*, 1984). Uma caracterização melhor destes genes foi realizada em 1985 por Djordjevic e colaboradores. Através de mapeamento por inserção do transposon Tn5 num fragmento de 14 kb do plasmídio Sym de *Rhizobium trifolii*, os autores puderam determinar uma região de 1.5 kb relacionada com o reconhecimento de hospedeiros e outras com a nodulação. Innes *et al.* (1985) através de fusão dos genes *hsn* e *nod* (nodulação) de *Rhizobium* com o transposon mini-Mu-lac puderam analisar a expressão destes genes e constataram que em meio comum de crescimento não havia transcrição dos genes *nod*, com exceção do gene *nodD*, e nem de uma região denominada região III, envolvida com o reconhecimento de hospedeiros. Porém, quando adicionaram ao meio raízes de trevo (*Trifolium repens*, hospedeiro de *R. trifolii*) ocorreu a transcrição de todos os genes *nod* e da região III (*hsn*) após três horas. Estes dados sugerem que os genes *hsn* deste microrganismo, assim como a maioria dos genes envolvidos na nodulação, são induzidos por fatores provenientes do hospedeiro.

Em *R. meliloti*, através de sequenciamento, foram descritos 4 genes *hsn* (*hsnA*, *hsnB*, *hsnC* e *hsnD*) num fragmento de 6.6 kb também num plasmídio que transcrevem proteínas de 9.7, 41.7, 26.7 e 28.6 kd, respectivamente. A sequência dos produtos destes genes *hsn* foram comparadas com as de outras proteínas do GenBank (USA) e foi encontrada homologia do gene *hsnA* com uma proteína acyl carreadora. Os genes *hsnA* e *hsnB* também apresentaram homologia com os genes *nodE* e *nodF* de *R. leguminosarum*. Os autores concluíram que os genes *hsnA*, *hsnB* e *hsnC* estão envolvidos com o controle da

infecção e apenas o *hsnD* está relacionado com o reconhecimento do hospedeiro (Horvath *et al.*, 1986).

### 1.2.1.3 - Genes específicos de doença: *dsp* (“disease specific”)

Apenas um trabalho sobre genes *dsp* foi descrito no gênero *Xanthomonas*. Foi o primeiro trabalho de clonagem de genes de compatibilidade básica de bactérias deste gênero. Seal *et al.* (1990) trabalharam com *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Através de mutações insercionais com transposon Tn5 obtiveram o mutante M461, numa frequência de  $1 \times 10^{-3}$ , que produziu clorose ou fraca reação de hipersensibilidade em tomate e pimentão e manteve a capacidade de induzir reações de hipersensibilidade em plantas não hospedeiras (tabaco). Este mutante *dsp*<sup>-</sup> (mutante M461) apresentou níveis normais de produção de todas as enzimas extracelulares testadas: esterases, glicosidases, fosfátases, proteases, carboximetilcelulases e amilases. Em plântulas de tomate e pimentão este mutante apresentou um crescimento bastante reduzido quando comparado com a linhagem patogênica. Tanto o mutante, quanto a linhagem selvagem, não possuem plasmídios indicando que o gene *dsp* é cromossomal. Dando continuidade à caracterização deste gene foi construído um banco genômico da linhagem selvagem e usado para complementar o mutante M461. Um dos clones do banco (p6AD4) de 22 kb foi capaz de restaurar tanto a patogenicidade para tomate como a sua capacidade em induzir hipersensibilidade em pimentão. Esta complementação foi testada em folhas de tomate e pimentão por infiltração. O mutante complementado não atingiu o mesmo nível de virulência da linhagem selvagem. Os autores acreditam que esta restauração parcial das características da linhagem selvagem possa ser devido à instabilidade do plasmídio do banco no mutante ou mesmo à baixa expressão do gene clonado neste plasmídio. Não houve mais publicação dando continuidade deste trabalho ou de outros sobre estes genes. Portanto, não se tem maiores conhecimentos sobre genes *dsp* de *Xanthomonas*.

Tharaud *et al.* (1990) obtiveram mutantes *dsp*<sup>-</sup> de *E. amylovora* por inserção com fago MudIIPR13. Através de experimentos de mapeamento localizaram estes genes numa região de 40 kb já descritos como “cluster” *hrp* (Steinberger & Beer, 1988; Barny *et al.*, 1990; Bauer & Beer, 1991). Barny *et al.* (1990) considerou uma sub-região deste “cluster” como *dsp*. Trata-se de uma região envolvida com a patogenicidade em plantas hospedeiras mas não com a indução de HR em não hospedeiros. Bauer & Beer (1991) encontraram mutantes para este “cluster” *dsp* que mostraram-se não patogênicos para hospedeiros compatíveis, porém, apresentaram uma HR atenuada não sendo possível delimitar duas regiões, uma *dsp* e outra *hrp*. Como foi descrito anteriormente, o mutante *dsp*<sup>-</sup> nada tinha de alterado com relação à resposta de HR em plantas não hospedeiras.

#### **1.2.1.4 - Genes de patogenicidade e de resposta de hipersensibilidade - *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity)**

Os primeiros genes *hrp* descritos foram descritos em *P. syringae* pv. *phaseolicola*, agente causador do crestamento bacteriano do feijão (Lindgren *et al.*, 1986). Genes desta classe já foram descritos em vários outros patovares deste microrganismo e também em bactérias do gênero *Erwinia* e *Xanthomonas* (ver revisão de Willis *et al.*, 1991). Em *P. syringae* pv. *phaseolicola*, através de mutações insercionais e complementação com banco genômico de linhagem selvagem, isolou-se um fragmento de 22 kb contendo genes *hrp*. Neste fragmento foram determinados nove grupos de complementação: *hrpA*, *hrpB*, *hrpC*, *hrpD*, *hrpE*, *hrpF*, *hrpL*, *hrpS*, e *hrpR*. Este “cluster” de *P. syringae* pv. *phaseolicola* é conservado física e funcionalmente em outros patovares de *P. syringae* (Huymh *et al.*, 1989; Lindgren *et al.*, 1988). Em *P. syringae* pv. *syringae* foi localizado, por mutação e complementação, um gene *hrp* denominado *hrpM* que não apresentou homologia com nenhum outro até então descrito. Mais tarde este mesmo gene foi localizado em *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Mills & Mukhopadhyay, 1990). Neste mesmo patovar foi descrito um “cluster” *hrp/hrm* 61 consistindo de 13 grupos de complementação mais um locus

denominado *hrmA* (Huang *et al.*, 1991; Xiao *et al.*, 1992). Estes 13 grupos de complementação denominados *hrpI-XIII* se expressam através de 8 unidades de transcrição em meio mínimo e no tecido de tabaco (não hospedeira) na mesma intensidade e são reprimidos na presença de aminoácidos complexos, como peptona, indicando que a expressão de tais genes *hrp* é controlada por fatores nutricionais da bactéria (Xiao *et al.*, 1992).

O locus *hrmA* tem função de modulação da expressão dos genes *hrp* durante interação incompatível (Huang *et al.*, 1991). Mutantes *hrmA*<sup>-</sup> são patogênicos para os hospedeiros sensíveis e não apresentam capacidade de induzir resposta de hipersensibilidade em planta não hospedeira (Heu & Hutcheson, 1993). A expressão deste “cluster” foi testada em *E. coli* e constatou-se que estes genes não só se expressavam, como a bactéria foi capaz de induzir hipersensibilidade em folhas de tabaco. Também foi observado que esta capacidade de elicitar a reação de defesa da planta era dependente de genes *ompC* e *ompF* da bactéria, responsáveis pela permeabilidade da membrana externa a solutos hidrofílicos. Tais resultados sugerem que a indução de hipersensibilidade ocorre via porinas de membrana e que o elicitor dessa resposta da planta seja um composto hidrofílico de baixo peso molecular (Li *et al.*, 1992). Resultados de sequenciamento dos genes *hrpJ* (ou *hrpX*) e *hrpI* (ou *hrpIX*) demonstraram homologia do gene *hrpI* com genes codificadores de uma superfamília de proteínas LcrD de *Y. pestis* associadas com a translocação de proteínas de virulência “YOP” através da membrana da bactéria (Huang *et al.*, 1993).

Em *P. solanacearum* foi localizado um “cluster” *hrp* em um fragmento de 22 kb de DNA plasmidial (Boucher *et al.*, 1988). Este “cluster” apresentou-se conservado em todas as linhagens virulentas de *P. solanacearum* testadas e até mesmo em diferentes patovares de *X. campestris*. Porém, não foi encontrada homologia com o gênero *Erwinia*. Arlat *et al.* (1982) analisaram a organização e expressão destes genes *hrp* de *P. solanacearum* e demonstraram que este “cluster” está organizado em pelo menos seis unidades de transcrição e apresenta 19 genes (Gijsegen *et al.*, 1995). Os fatores que induzem ou

reprimem estes genes são idênticos aos descritos para *P. syringae* pv. *syringae*. Sequenciamento deste “cluster” *hrp* de *P. solanacearum* e comparação com sequências de DNA em banco de dados revelou grande homologia com genes de secreção bacteriana de outras espécies ( Gough *et al.*, 1992) . Estes autores analisaram os genes *hrpA*, *hrpI* e *hrpO* desta bactéria e também encontraram similaridade entre estes genes e genes relacionados com a exportação de fatores de virulência de *Yersinia*, bactéria patogênica para humanos. Como os genes *hrpJ* e *I* de *P. syringae* pv. *phaseolicola*, estes genes também são homólogos a *hrp* de *X. campestris* pv. *campestris*, *E. amylovora* e entre outros patovares de *P. solanacearum*. Sugere-se a partir desses resultados haver um mecanismo comum de patogenicidade entre diferentes microrganismos patogênicos. Estes autores determinaram cinco unidades de transcrição necessárias para a secreção da proteína PopA1 (Arlat *et al.*, 1994), indutora da resposta de hipersensibilidade produzida por *P. solanacearum*. Gijsegem *et al.* (1995) sequenciaram outros genes *hrp* do “cluster” *hrp* deste patovar e encontraram genes homólogos ao sistema de secreção de bactéria tipo III semelhante ao de *Yersinia* e que codificam proteínas relacionadas ao complexo de biogênese de flagelo de bactérias. Este sistema de secreção tipo III de bactéria envolve um mecanismo de secreção de produtos protéicos que não apresentam peptídeo sinal aminoterminal e inclui um grande número de genes em “cluster” responsável pelo transporte dessa proteína. É um mecanismo de secreção independente de genes *sec* de secreção geral de bactérias Gram-negativas do citoplasma para o espaço periplasmático (Salmond & Reeves, 1993). Proteínas *hrp* codificadas por estes genes sequenciados também apresentam homologia com proteínas de *Rhizobium* envolvidas na especificidade de nodulação (Gijsegem *et al.*, 1995).

*E. amylovora* possui um “cluster” *hrp* de 39.7 kb (Laby & Beer, 1992; Wei *et al.*, 1992). Sete loci deste “cluster” são essenciais para a reação de hipersensibilidade de *E. amylovora*. Estudos de expressão destes loci revelaram grande semelhança com a expressão dos genes *hrps* de *Pseudomonas*. Estes genes se expressam em plantas e em meios contendo manitol, sais e sulfato de amônia e são regulados por temperatura, pH, fontes de carbono e

nitrogênio (Wei *et al.*, 1992). Laby & Beer (1992) encontraram homologia entre os genes *hrp* de *E. amylovora* e *hrp* de outras bactérias, entre elas *P. syringae* pv. *syringae* e outras espécies de *Erwinia*. Dentro do gênero *E. amylovora* este “cluster” parece ser conservado. Porém, os autores não encontraram homologia em *P. syringae* pv. *glycinea*, *X. campestris* pv. *manihotis*, *X. campestris* pv. *phaseoli* e *X. campestris* pv. *vesicatoria* dentre outras. Uma melhor caracterização de um gene *hrp* de *E. amylovora* foi realizada por Wei & Beer (1993) através de sequenciamento do gene *hrpI*. Este gene é responsável pela secreção de uma proteína elicitora de resposta de hipersensibilidade desta bactéria. Mutantes para este gene produzem o elicitor mas não o exportam. Este gene é similar ao LcrD de *Yersinia*, *hrpI* de *P. syringae* pv. *syringae*, *hrpO* de *P. solanacearum* e *hrpC2* de *X. c.* pv. *vesicatoria*. Dois outros loci estão envolvidos na regulação da produção do elicitor e quatro outros também estão envolvidos na sua secreção. Este elicitor, assim como proteínas secretadas pela família de proteínas LcrD não apresentam peptídeo sinal aminoterminal.

Hwang *et al.* (1992) descreveram o primeiro mutante *hrp<sup>-</sup>* de *Xanthomonas*. Este mutante de *X. campestris* pv. *campestris*, obtido por mutação com NTG (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina) não foi capaz de causar podridão negra em todas as crucíferas testadas e não induziu resposta de hipersensibilidade em plantas não hospedeiras. O locus de 2.1 kb que complementou esse mutante foi designado *hrpXc* (Kamoun & Kado, 1990). Alelos homólogos a esse gene foram localizados por hibridização em todas as linhagens de *X. campestris* pv. *campestris* analisadas. Co-inoculação deste mutante com a linhagem selvagem restaurou o crescimento do mutante, demonstrando que este tem deficiência num fator difusível requerido para a invasão do tecido do hospedeiro. Através da fusão do gene *hrpXc* com o gene *lux* foi possível avaliar a sua expressão e observou-se uma alta expressão no tecido de rabanete (hospedeiro). Estudando a expressão deste gene através de sua fusão com um outro gene “reporter”, *gusA* ( $\beta$ -glucuronidase) e *cat* (cloranfenicol acetil-transferase), descritos por Jefferson *et al.* (1986) e Kamoun *et al.* (1989), Kamoun *et al.* (1992) observaram que mutantes *hrpXc<sup>-</sup>* (de *X. campestris* pv. *campestris*) e *hrpXa<sup>-</sup>* (de

*X. campestris* pv. *armoraciae*), que não induzem resposta de hipersensibilidade em plantas não hospedeiras, quando inoculados em plantas hospedeiras induziram uma reação de hipersensibilidade vascular nessas plantas. Respostas semelhantes foram obtidas quando inocularam nestas plantas linhagens de *X. campestris* pv. *campestris* incompatíveis. A co-inoculação de mutantes *hrpXc*<sup>-</sup> com a linhagem selvagem suprimiu esta resposta vascular. A partir destes dados os autores supõem um envolvimento desses genes com a supressão de mecanismos de defesa da planta. Resultados similares foram observados em *P. solanacearum* pv. *tabaci*. Folhas de feijão foram pré-inoculadas com mutantes *hrp*<sup>-</sup> de *P. syringae* pv. *tabaci* e após algum tempo foram reinoculadas, agora com o patovar *phaseolicola* deste patógeno, e observou-se que a planta se apresentava mais resistente a esta última bactéria demonstrando que mecanismos de resistência haviam sido ativados (Lindgren & Jacokek, 1990). O fato do mutante *hrp*<sup>-</sup> não ser capaz de suprimir mecanismos de defesa do hospedeiro explica a incapacidade de crescimento nos tecidos da planta (Bonas *et al.*, 1991). Por experimentos de complementação foi encontrada homologia funcional entre os genes *hrpXc* e *hrpXa* com o *hrpXo* (de *X. oryzae* pv. *oryzae*). Estes genes são funcionalmente equivalentes, podendo se complementar. Análise de sequência do gene *hrpXo* revelou um quadro de leitura de 1.4 kb capaz de codificar uma proteína de 52.3kDa. Esta proteína contém um domínio consenso que pode sofrer modificação por uma proteína exclusiva de plantas (meristoil transferase). Com este novo produto, a bactéria deixaria de ser reconhecida pelos mecanismos de defesa da planta (Kamdar *et al.*, 1993).

Através de hibridização de colônia de banco genômico de *X. campestris* pv. *campestris* e de *X. campestris* pv. *vitians* usando como sonda genes *hrp* de *P. solanacearum* foi possível localizar genes homólogos nos dois patovares de *X. campestris* (Arlat *et al.*, 1991). Por meio de “marker-exchange”, Arlat *et al.* (1991) mutagenizaram os loci *hrp* destes dois patovares. Foi obtida a complementação de *X. campestris* pv. *vitians* *hrp*<sup>-</sup> com “cluster” *hrp* de *X. campestris* pv. *campestris*, entretanto, somente alguns mutantes de *X. campestris* pv. *campestris* *hrp*<sup>-</sup> foram complementados por genes de *X. campestris* pv.

vitians. Não se sabe se esse insucesso foi devido a baixa homologia entre os genes dos diferentes patovares ou algum outro fator.

Em *X. campestris* pv. *vesicatoria* os genes *hrp* foram localizados num “cluster” de cerca de 25 kb com seis grupos de complementação designados *hrpA*, *hrpB*, *hrpC*, *hrpD*, *hrpE* e *hrpF* (Bonas *et al.*, 1991). Schulte & Bonas (1992) determinaram a orientação e a expressão destes genes através de suas fusões com Tn3::*gus*. Determinou-se assim que *hrpA* e *hrpB* são transcritos numa orientação contrária à dos demais genes. Quanto à suas expressões, medidas pela atividade de β- glucuronidase (procedente do gene *gus*), observou-se que os loci *hrp* eram fortemente induzidos depois da inoculação da bactéria na planta. Para determinar a propriedade do fator da planta indutor destes genes foram conduzidos vários experimentos. Os pesquisadores utilizaram filtrado de cultura de células de tomate em suspensão (TCM) para induzir estes genes. Concluíram que o fator indutor da transcrição destes genes *hrp* é um composto pequeno, orgânico, hidrofílico e termoestável. Como já foi visto no relato de expressão de outros genes *hrp*, onde vários fatores podem alterar suas expressões, a regulação desses genes parece envolver diversos mecanismos.

Análise de sequência de alguns loci *hrp* do patovar *vesicatoria* (*hrpA*, *hrpB* e *hrpC*) e comparação com banco de dados revelou que as proteínas codificadas por estes genes são similares às proteínas dos patógenos de mamíferos *Shigella flexneri*, *Y. enterocolitica* e *Y. pestis*. Estas proteínas são similares a ATPases e proteínas Ysc e LcrD de *Yersinia*. Tais resultados demonstram uma conservação dos mecanismos de patogenicidade nos procariotos. Os autores Fenselau *et al.* (1992) acreditam que os genes *hrp* estejam envolvidos na secreção de moléculas relacionadas com o mecanismo de interação planta-patógeno. Os papéis dos genes *hrp* parecem ser bastante distintos. Alguns genes têm papel na regulação da transcrição de outros *hrp*, outros na síntese e exportação de fatores de patogenicidade (Clarke *et al.*, 1992; Gough *et al.*, 1992). Sabe-se também que mutações *hrp*<sup>-</sup> inibem a transcrição ou a função de outros genes envolvidos na interação planta-bactéria, como os genes de avirulência em *P. syringae* pv *glycinea* (Huynh *et al.*, 1989;

Lindgren *et al.*, 1988) e genes de avirulência de *X. campestris* pv. vesicatoria (Fenselau *et al.*, 1992). Com estes dados parece-nos haver uma relação entre os genes *hrp* e outros genes de patogenicidade. Fenselau *et al.* (1992) sugerem um modelo para interação entre genes *hrp* e *avr*: fatores da planta ativariam genes *hrp* e o produto desse genes formariam canais de membrana responsáveis pela secreção dos produtos dos genes *avr*. Mas isso ainda não foi comprovado.

**Parte I**

**Caracterização de um gene *hsv* de *X. campestris* pv. *vesicatoria***

## I - 1 - MATERIAL E MÉTODOS

### I-1.1 - Linhagens bacterianas e plasmídios

As linhagens de *X. campestris* e *Escherichia coli* utilizadas estão relacionadas na tabela I.

Tabela I - Linhagens de bactérias utilizadas

Linhagem	Características	Fonte ou referência
<b><i>X. campestris</i></b>	<b>Patógeno</b>	
<b>pv.vesicatoria</b>	<b>de tomate e pimentão</b>	
317	Tipo selvagem	SBF-IB, Campinas,S.P.
479	Tipo selvagem	SBF-IB, Campinas,S.P.
401	Tipo selvagem, compatível apenas com pimentão	SBF-IB, Campinas,S.P.
411	Tipo selvagem, compatível apenas com pimentão	SBF-IB, Campinas,S.P.
484	Tipo selvagem	SBF-IB, Campinas,S.P.
<b>pv. manihotis</b>	<b>Patógeno de mandioca</b>	
289	Tipo selvagem	SBF-IB, Campinas,S.P.
289Nal <sup>I</sup>	289, resistente ao ácido nalidíxico.	Laboratório de Genética de Bactérias-CBMEG-Unicamp
289Nal <sup>I</sup> /pUFR027	289Nal <sup>I</sup> contendo o vetor pUFR027. Compatível com mandioca	Este trabalho

SBF-IB - Seção de Bacteriologia Fitopatológica, Instituto Biológico

Tabela I -Linhagens de bactérias utilizadas (continuação)

Linhagem	Características	Fonte ou referência
289NaI <sup>f</sup> /51	289NaI <sup>f</sup> contendo o plasmídio pVM51. Compatível com tomate	Marques, L.L., 1992
289NaI <sup>f</sup> /71	289NaI <sup>f</sup> contendo o plasmídio pVM71. Compatível com tomate	Marques, L.L., 1992
289NaI <sup>f</sup> /73	289NaI <sup>f</sup> contendo o plasmídio pVM73. Compatível com tomate	Marques, L.L., 1992
289NaI <sup>f</sup> /74	289NaI <sup>f</sup> contendo o plasmídio pVM74. Compatível com tomate	Marques, L.L., 1992
<b>pv. campestris</b>	<b>Patógeno de crucíferas</b>	
Ca110	Tipo selvagem	Fundação "André Tosello", Campinas, S.P.
<b>pv. glycines</b>	<b>Patógeno de leguminosas</b>	
333	Tipo selvagem	SBF-IB, Campinas, S.P.
333Sp <sup>f</sup>	333, resistente à espectinomicina	Laboratório de Genética de microrganismos -CBMEG- Unicamp.
333Sp <sup>f</sup> /73	333Sp <sup>f</sup> contendo o plasmídio pVM73	Este trabalho
<b>pv. phaseoli</b>	<b>Patógeno de feijão</b>	
558	Tipo selvagem	SBF-IB, Campinas, S.P.
558/73	558 contendo o plasmídio pVM73	Este trabalho
<b>pv. citri</b>	<b>Patógeno de cítricos</b>	
223	Tipo selvagem, patógeno de <i>Citrus sinensis</i>	SBF-IB, Campinas, S.P.

---

Tabela I -Linhagens de bactérias utilizadas (continuação)

---

Linhagem	Características	Fonte ou referência
<i>P. chikorii</i>	<b>Patógeno de Gérbera</b>	
1053	Tipo selvagem	SBF-IB, Campinas,S.P.
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	<i>supE44, lacU169(80lacZM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi<sup>-</sup>, relA1.</i>	Hanahan, 1983

---

Os plasmídios utilizados estão relacionados na tabela II

Tabela II - Plasmídios utilizados

Plasmídios	Características	Fonte ou Referência
pUFR027	<i>incW</i> , <i>Km<sup>r</sup></i> , <i>mob<sup>+</sup></i> , <i>lacZα<sup>+</sup></i> , <i>par<sup>+</sup></i>	De Feyter <i>et al</i> , 1990 (Figura 1)
pVM51	pUFR027 contendo o fragmento <i>EcoRI</i> de 3 Kb de banco genômico de <i>X. campestris pv. vesicatoria</i> (317)	Marques, 1992
pVM71	pUFR027 contendo o fragmento <i>EcoRI</i> de 2.2 Kb de banco genômico de <i>X. campestris pv. vesicatoria</i> (317)	Marques, 1992
pVM74	pUFR027 contendo o fragmento <i>EcoRI</i> de 6 Kb de banco genômico de <i>X. campestris pv. vesicatoria</i> (317)	Marques, 1992
pVM73	pUFR027 contendo o fragmento <i>EcoRI</i> de 2.2 Kb de banco genômico de <i>X. campestris pv. vesicatoria</i> (317)	Marques, 1992
pBluescriptIISK+	Vetor de 2,96 Kb, <i>Amp<sup>r</sup></i>	Stratagene (Figura 2)
pK73	pBluescriptIISK+ contendo o fragmento <i>EcoRI</i> de 2.2 Kb do pVM73.	Este trabalho

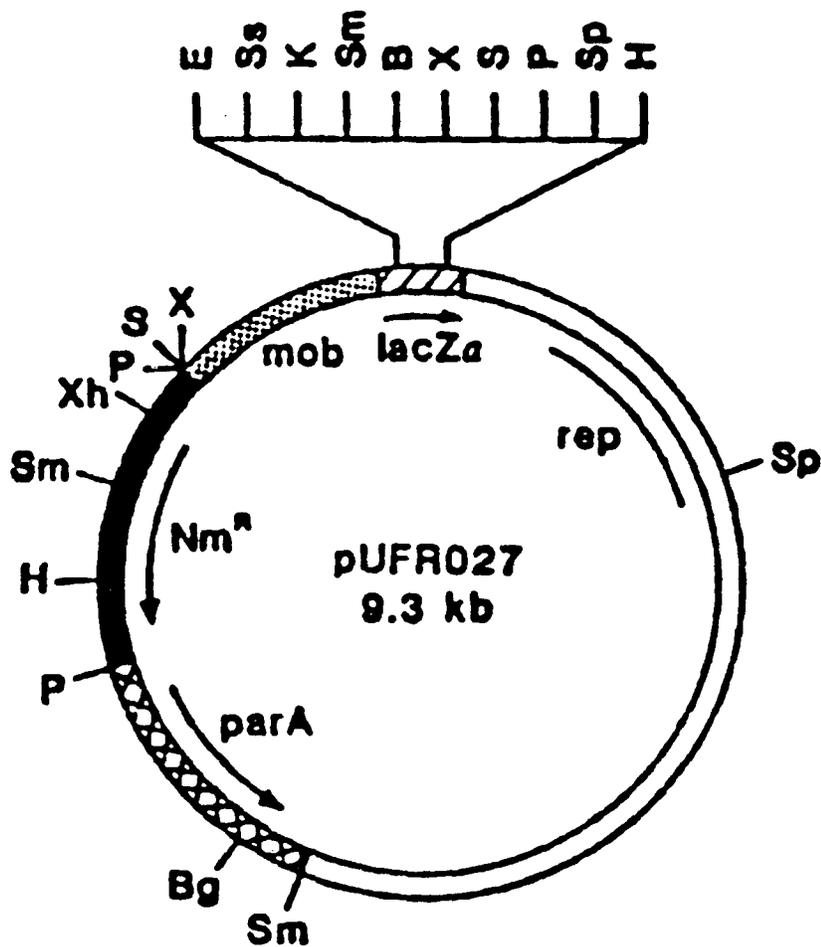


Figura 1 - Representação esquemática do vetor pUFR027, funcional em *Xanthomonas* e *E. coli*. Os sítios de restrição são indicados pelas seguintes abreviações: B, *Bam*HI; Bg, *Bg*II; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; K, *Kpn*I; P, *Pst*I; S, *Sst*I, Ss, *Sst*II; Sa, *Sal*I; Sm, *Sma*I; Sp, *Sph*I; X, *Xba*I e Xh, *Xho*I (De Feyter, *et al.*, 1990).

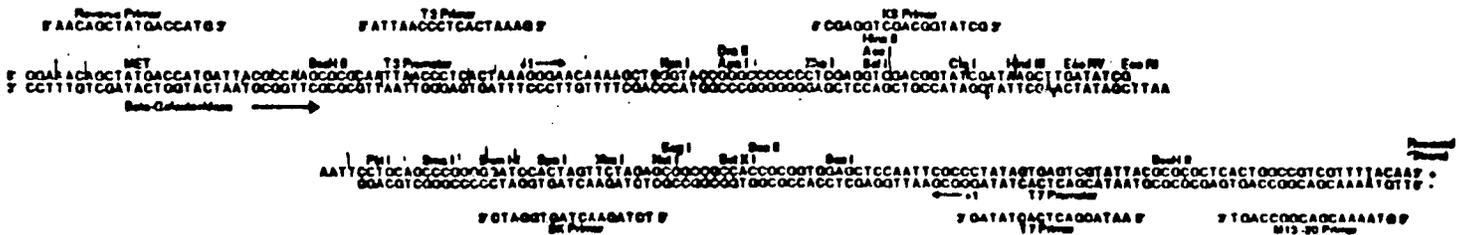
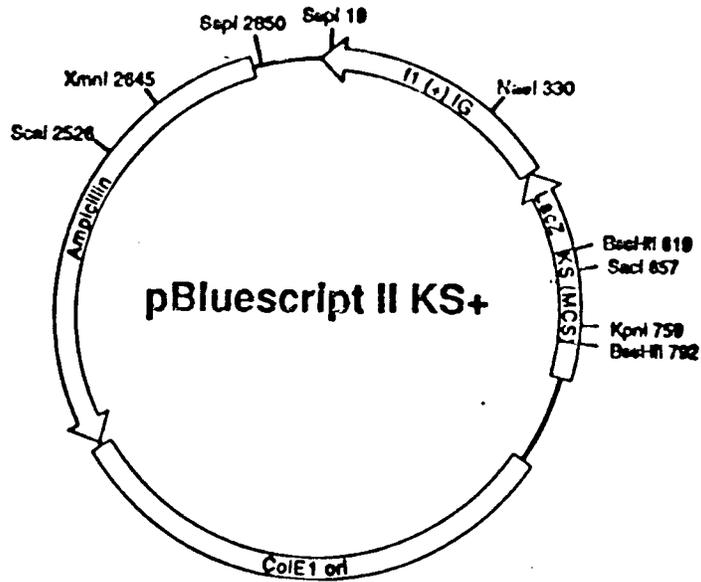


Figura 2 - Representação esquemática do vetor pBluescriptIIKS+ (acima) e de sua região de policlonagem (abaixo). Os sítios de restrição para diferentes enzimas estão indicados na figura.

## 2 - Cultivares de plantas

Os cultivares de planta utilizados estão relacionados na Tabela III

Tabela III - Cultivares de plantas utilizadas nos testes de patogenicidade

Planta	Cultivar	Procedência
Tomate ( <i>Lycopersicum esculentum</i> )	Petomech VF 1&2	Petoseed Co., Inc.
Pimentão ( <i>Capsicum annum</i> )	Casca dura Ikeda	Agroflora
Tabaco ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	Petit Havana SR1	Maligna <i>et al.</i> , 1973
Feijão ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	Deconhecido	Comercial
Mandioca ( <i>Manihotis esculentum</i> )	Vassourinha	IAC, Campinas, S.P.

IAC - Instituto Agronômico de Campinas

### I -1.3 - Meios de cultura e antibióticos

#### A) Meios de cultura para *Xanthomonas*

Para o crescimento de *Xanthomonas* os meios de cultura utilizados foram NYGB (meio líquido completo) sob agitação de 250 rpm e NYGA (meio sólido completo) descritos por Turner *et al.* (1984) à 28°C.

#### Meio NYGB (líquido)

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

O meio NYGA sólido foi preparado acrescentando-se 10 g de ágar a cada litro de NYGB.

#### **B) Meio de cultura para *E. coli***

Linhagens de *E. coli* foram crescidas em meio LB (Maniatis *et.al.*, 1982) líquido sob agitação de 250 rpm ou sólido (com 1% de ágar) à 37°C.

#### Meio LB (Luria-Bertani)

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

O pH do meio foi ajustado para 7.5 com NaOH.

#### **C) Meio para germinação de sementes**

Para a germinação de sementes foi utilizado o meio MS (Murashigue & Skoog, 1962), em formas de mini-gelo (cerca de 1ml de meio por poço contendo uma semente) para tomate e pimentão. A germinação foi realizada em câmara de germinação (Forma Scientific) com fotoperíodo (8 horas de luz) e temperatura (30°C) controlados.

## Meio MS

solução de macronutrientes (ver quadro abaixo)	25,0 ml
solução de micronutrientes (ver quadro abaixo)	0.5 ml
Vitaminas	0.5 ml
Fe-EDTA	2.5 ml
Ágar	10,0 g
Água q.s.p. 1000ml	

O pH do meio foi ajustado para 5.7 com NaOH.

Solução de macronutrientes		Solução de micronutrientes	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	15.5 g/l	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2 g/l
KNO <sub>3</sub>	19.0 g/l	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	21.7 g/l
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	4.4 g/l	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	9.1 g/l
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3.7 g/l	KI	0.83 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.7 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

## D) Antibióticos

As concentrações dos antibióticos utilizados em meio sólido foram : ácido nalidíxico (Nal), 50 mg/ml; canamicina (Km), 25 mg/ml; gentamicina (Gm), 5 mg/ml; espectinomicina (Sp), 50 mg/ml e estreptomicina (Sm), 100 mg/ml. Em meio líquido utilizou-se a metade destas concentrações.

### I -1.4 - Testes de patogenicidade

#### I- 1.4.1 - Descontaminação e germinação de sementes

Para descontaminar as sementes, estas foram embebidas em solução 10 % (V/V) de hipoclorito de sódio comercial e 200 µl de detergente comercial/10 ml de água esterilizada por 5 minutos. Em seguida foram efetuadas sucessivas lavagens com água esterilizada para retirar o hipoclorito e o detergente.

Descontaminadas, as sementes foram germinadas em caixas de mini-gelo esterilizadas por autoclavagem por 20 minutos, contendo meio MS (Murashigue & Skoog, 1962) em câmara de germinação com fotoperíodo (8 horas de luz) e temperatura (30°C) controlados.

#### **I -1.4.2 - Teste em sementes**

Este teste foi realizado segundo Gough *et al.* (1988).

As linhagens de bactéria a serem testadas foram crescidas em meio NYGB sob agitação por 15 horas, centrifugadas a 12000 rpm por 3 minutos e suspensas em solução de NaCl 0.9 %. A absorbância da suspensão, medida à 600 nm, foi ajustada para 0.2 através da adição de solução de NaCl 0.9 %. As sementes descontaminadas ficaram embebidas nesta suspensão por uma hora sob agitação de 50 rpm à temperatura ambiente. Em seguida foram secas em papel de filtro, transferidas para formas de mini-gelo com meio MS e colocadas dentro de caixas plásticas esterilizadas e cobertas com filme de PVC. Estas caixas ficaram em câmara de germinação até o final da avaliação do teste.

Para a contagem do número de bactérias por plântula originada de sementes infectadas retirou-se amostras a partir de 9 dias após a germinação (período em que as plântulas do controle positivo começaram a apresentar sintomas de patogenicidade). De um total inicial de 56 plântulas de cada tratamento, três foram retiradas a cada dia, aleatoriamente e maceradas em 1ml de solução de NaCl 0.9 %. A suspensão foi diluída e plaqueada em meio NYGA com antibiótico(s) adequado(s). Foram retiradas amostras em intervalos de 24 horas, até o 12º dia após o tratamento, quando as plântulas testadas com o controle positivo já se encontravam completamente apodrecidas.

#### **I -1.4.3 - Teste em plântulas**

O teste foi realizado de acordo com Daniels *et al.* (1984b).

Cada linhagem foi inoculada com a ajuda de agulha em uma plântula com aproximadamente 4 cm de comprimento. Foram testadas 50 plântulas por linhagem. As respostas foram avaliadas nos 7 dias posteriores.

#### **I-1.4.4 -Teste em hipocótilos**

Realizado segundo Marques e Rosato (1995).

Os hipocótilos de plântulas de tomate com aproximadamente 4 cm de comprimento foram cortados. Os segmentos de hipocótilo com cerca de 1,5 cm tiveram uma de suas extremidades tocadas na colônia a ser testada. Em seguida o hipocótilo foi colocado numa placa com ágar-água (1%). As placas com os hipocótilos foram mantidas numa estufa a 28°C. A avaliação foi efetuada nos quatro dias posteriores.

Para a contagem do número de bactérias por hipocótilo foram colhidos três hipocótilos a partir do momento do inóculo a cada 24 horas, de um total de 40, aleatoriamente. Os três hipocótilos foram macerados em 1ml de solução de NaCl 0.9 %, a suspensão foi diluída e plaqueada em meio NYGA com antibiótico(s) adequado(s). As placas de NYGA foram mantidas por 48 horas a 28°C e a contagem do número de colônias efetuada.

#### **I-1.4.5 -Teste em folhas**

Este teste foi realizado segundo Niepold *etal.* (1985).

As plantas foram mantidas em sacos plásticos com terra e deixadas ao ar livre. Quando estavam com cerca de 30 cm de altura foram trazidas para o laboratório, um dia antes de serem inoculadas. Foram molhadas em abundância e cobertas com saco plástico para manter os estômatos das folhas abertos e facilitar a infiltração das bactérias.

As bactérias a serem testadas cresceram 15 horas em meio NYGB sob agitação. Foram centrifugadas e suspendidas em solução de NaCl 0.9 %. A absorbância da suspensão, medida a 600 nm, foi ajustada para 0.5 através da adição de solução de NaCl 0.9 %. Com o

uso de seringas hipodérmicas estas suspensões foram inoculadas na superfície abaxial das folhas. Foram utilizados 50 µl da suspensão por inóculo. A planta inoculada foi novamente envolvida em saco plástico para manter a umidade favorável ao desenvolvimento bacteriano. A resposta foi avaliada nos dez dias seguintes. As plantas foram mantidas à temperatura ambiente.

### **I-1.5 - Manipulação de DNA**

#### **I-1.5.1 - Extração de plasmídeo em pequena e média escala**

A extração de DNA plasmidial em pequena escala foi efetuada de acordo com o protocolo de extração alcalina descrita por Sambrook *et al.* (1989). Para a extração em média escala, a partir de 30 ml de cultura após 16 horas, o mesmo protocolo usado para extração em pequena escala foi utilizado, porém os volumes das soluções foram modificados, guardando as proporções.

#### **I-1.5.2 - Extração de DNA cromossômico**

A extração de DNA cromossômico foi efetuada em média escala (Young & Blakesley, 1991) utilizando-se SDS e proteinase K. A purificação desse material foi realizada com fenol e clorofórmio como descrito por Sambrook *et al* (1989). O DNA foi dialisado por 48 horas em 1 litro de tampão Tris-EDTA, pH 8.0 (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1mM). Para concentrar o DNA, a desidratação foi efetuada com polietilenoglicol 8.000 (Sigma). A membrana de diálise contendo o DNA dissolvido nesse tampão Tris-EDTA foi encoberta com polietilenoglicol 8000 por um período de tempo suficiente para que o volume de tampão dentro da membrana se reduzisse à quantidade desejada.

#### **I-1.5.3 - Digestões de DNA com enzimas de restrição**

Os DNAs, plasmidiais e cromossômicos, foram digeridos com enzimas de restrição de acordo com as condições descritas pelo fabricante. Para digestões de DNAs

cromossômicos, o material foi incubado com a enzima durante a noite (aproximadamente por 16 horas).

#### **I-1.5.4 - Transformação de *X. campestris***

A transformação de *X. campestris* com plasmídios foi realizada através de eletrotransformação. A preparação das células competentes foi efetuada de acordo com o protocolo descrito por Ferreira *et al.* (1995). Os plasmídios foram inseridos nestas células competentes através de pulsos de 1.8 kV/cm usando-se cubetas de 0,1 cm (condições descritas pelo fabricante, BRL, para *E. coli*). Foram utilizados aproximadamente 100 ng de DNA plasmidial num volume de 2 µl para transformar um volume de 60 µl de células competentes. Após o pulso foi adicionado 1ml de meio NYGB e as células foram mantidas a 28°C por uma hora. Em seguida a suspensão foi diluída e plaqueada em meio NYGA contendo o(s) antibiótico(s) necessários.

#### **I-1.5.5 - Isolamento de fragmento de DNA de gel e ligação a vetores plasmidiais**

Fragmento de DNA obtido a partir de digestão com enzimas de restrição e separado por eletroforese em gel de agarose 0.8% foi retirado do gel segundo o método de Heery *et al.* (1990). O bloco de agarose contendo o fragmento foi cortado e centrifugado dentro de um tubo de microcentrífuga (0.5 ml) contendo no fundo, perfurado com uma agulha, lâ de vidro siliconizada. Este tubo perfurado foi colocado em um outro tubo de microcentrífuga maior (1,5 ml). Estes tubos foram centrifugados por 15 minutos a 6000 rpm, à temperatura ambiente. O líquido coletado no tubo maior, contendo o DNA, foi submetido a limpeza com igual volume de fenol e clorofórmio (1Volume: 1Volume) e precipitação com 1/10 do volume de acetato de potássio 3M e dois volumes de etanol absoluto para concentrar o DNA. Este fragmento foi ligado a plasmídios previamente digeridos com enzimas de restrição. A ligação foi realizada com T4 DNA ligase de acordo com as condições indicadas pelo fabricante (Gibco-BRL). Usou-se o produto desta ligação para transformar células

DH5 $\alpha$  competentes. Estas células competentes foram preparadas de acordo com Nashimura *et al.*(1990). Os recombinantes da transformação foram selecionados em placas LB com antibiótico (resistência conferida pelo vetor) e Xgal (de acordo com Sambrook *et.al.*, 1989). Uma colônia branca, contendo inserto, foi isolada e submetida a extração de plasmídios que foram digeridos com enzimas de restrição para confirmar a clonagem.

#### **I- 1.5.6 - Hibridização**

Os fragmentos de DNA genômico e plasmidial digeridos com enzimas de restrição foram separados por eletroforese em gel de agarose 0.8% e transferidos para membrana de náilon Hybond-N, da Amersham (transferência alcalina descrita por Sambrook *et al.*, 1989) que foi hibridizada com sonda não radioativa. A marcação da sonda foi efetuada com digoxigenina utilizando-se o kit “DIG DNA labelling and detection kit” da Boehringer-Mannheim. A hibridização foi realizada de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante do kit de marcação da sonda, com 50 % de formamida a 42°C por 16 horas. Após a hibridização a membrana foi lavada uma vez com SSC 2X (8,82 g ácido trissódico.2H<sub>2</sub>O e 17.5 g de NaCl/l água)e 0,5 % SDS por 3 minutos; duas vezes por 15 minutos com SSC 2X e 0,1 % SDS; duas vezes por 20 minutos com SSC 0,1X e 0,1 % SDS à 60°C; 3 minutos com SSC 1X. A hibridização foi detectada por quimioluminescência usando-se CSPD (Boehringer-Mannheim, FRG) e filmes de raio-X Fuji (“Fuji Medical X-Ray Film”).

#### **I - 1.5.7 -Deleção unidirecional e sequenciamento dos clones**

O plasmídio contendo o fragmento a ser sequenciado foi deletado unidirecionalmente de acordo com Henikoff (1987). Para tal, digeriu-se 10  $\mu$ g do plasmídio pK73 com *ApaI* (sítio único no vetor e ausente no inserto). Esta enzima deixa extremidade 3' protuberante no DNA. Em seguida acrescentou-se ao mesmo sistema de digestão com *ApaI* a enzima *HindIII* e a quantidade de NaCl foi ajustada de acordo com a necessidade desta segunda enzima (*HindIII* digere o DNA deixando extremidade 5' protuberante). As condições de

digestão foram as mesmas indicadas pelo fabricante (Gibco-BRL). Após as digestões o sistema foi tratado com igual volume de fenol e clorofórmio (1volume:1 volume) e o DNA foi precipitado com NaCl 2M(1/10 do volume ) e dois volumes de etanol. O DNA recuperado (7µg) foi submetido a deleção unidirecional com Exonuclease III. As deleções foram realizadas a 37<sup>0</sup>C e alíquotas foram retiradas a cada 30 segundos para se obter clones com deleções de aproximadamente 250 bases e as reações paralizadas com EDTA. Os produtos destas deleções foram recircularizados com ligase e usados para eletrotransformar células de *E. coli* DH5α competentes. Através de extrações de plasmídeo em pequena escala (Birboin & Doly, 1979), digestão com enzimas de restrição e separação em gel de agarose, escolheu-se os subclones para serem sequenciados.

#### **I-1.5.7.1 - Reação de sequenciamento**

Para serem sequenciados, os subclones da deleção foram extraídos segundo o método de lise alcalina e purificados através de precipitação com polietilenoglicol (Maniatis *et al.*, 1989).

As reações foram realizadas com o Kit “T7 sequencing” da Pharmacia Biotech de acordo com o fabricante. Os primers utilizado foram o “M13 reverse sequence primer” da Pharmacia Biotech e o “M13/pUC forward amplification primer” da Gibco BRL . Para a marcação da reação de sequenciamento foi utilizado o nucleotídeo adenosina trifosfatado marcado com enxofre radioativo (S<sup>35</sup>).

#### **I-1.5.7.2 - Gel de sequenciamento**

##### **I-1.5.7.2.1 - Tratamento das placas**

As placas foram deixadas por 16 horas em solução de NaOH 0.4N. Foram em seguida lavadas com água e detergente e finalmente com SDS 2%. Para retirar o SDS foram enxaguadas com água em abundância.

Para desengurdurar as placas, estas foram limpadas com etanol absoluto e em seguida acetona (produtos da Merck).

Uma vez limpa a placa menor (53 cm de comprimento/22 cm de largura) foi tratada com a seguinte solução para que o gel, depois de pronto se mantivesse fixo a esta placa: 5 ml etanol absoluto:175 µl Ácido Acético:17 µl “BIND SILANE” (Pharmacia). Depois de seca, a placa foi limpa com papel absorvente umedecido com etanol absoluto para retirar o excesso da solução contendo o Bind-silane.

A placa maior (60 cm de comprimento/22 cm de largura) foi tratada com uma solução repelente, para que o gel não se fixasse nela. Usou-se 5 ml de “REPEL-SILANE” (Pharmacia) por placa. Esta solução foi espalhada com um papel absorvente. Depois de seca o excesso do repelente foi retirado com papel absorvente umedecido com água.

#### **I-1.5.7.2.2 - Preparação do gel**

##### **Gel 5%**

Uréia	25.2 g
Acrilamida 40%	7.5 ml
TBE5X (Maniatis <i>et al.</i> ,1989)	12,0 ml
Água q.s.p.	50 ml

A solução do gel foi mantida em banho-maria à 60°C até que a uréia se dissolvesse. Em seguida a solução foi filtrada utilizando-se filtros de poros com 0.45 µm (Sigma) para retirar possíveis cristais de uréia. À solução filtrada foram adicionados 480 µl de Persulfato de Amônio 0.4M e 30 µl de TEMED. A solução foi misturada e vertida entre as placas de vidro. O gel ficou polimerizando por 4 horas e em seguida foi deixado durante a noite (aproximadamente por 16 horas) na geladeira.

Para preparar géis 6% seguiu-se as mesmas condições exceto o volume de acrilamida 40%, que neste caso foi de 9 ml.

Antes de serem aplicadas as amostras da reação de sequenciamento nestes géis, foi realizada uma pré-corrída por 30 minutos a 2000 V. O tampão usado pra corrída de eletroforese foi o TBE 1X (Maniatis *et al.*, 1989). Os géis com 5% de acrilamida foram submetidos a eletroforese a 2000 V por 8 horas enquanto que os géis de 6% foram submetidos a eletroforese por 4 horas nesta mesma voltagem.

#### **I-1.5.7.2.3 - Fixação do gel**

Depois da eletroforese, os géis foram fixados em solução contendo 10 % de metanol/10 % de ácido acético por 30 minutos sob leve agitação. Em seguida o gel foi reidratado por meio de lavagem em água corrente e mantido durante a noite (aproximadamente por 16 horas) à 42<sup>o</sup>C para secar.

Depois de secos os géis foram expostos a filmes de raio-X de 18x43 cm por uma semana e revelados de acordo com as condições descritas pelo fabricante (Amersham).

#### **I-1.5.7.3 - Análise de sequência de DNA**

O resultado do sequenciamento foi comparado com bancos de sequências de DNA (GenBank e EMBL) através do programa FASTA (Pearson, 1990) e BLAST (Altschul, *et al.*, 1990) para checar possível homologia com outras sequências de DNA já descritas.

Para localizar quadros de leitura abertos (“ORFs”), determinar a porcentagem de guaninas e citosinas e sítios de enzimas de restrição utilizou-se o programa DNASIS (Pharmacia).

#### **I-1.5.8 - Padrão de proteínas totais**

##### **I-1.5.8.1 - Extração de proteínas totais**

A extração de proteínas totais foi realizada de acordo com Vauterin *et al.*, 1991.

As linhagens *X. campestris* pv. manihotis 289, *X. campestris* pv. manihotis 289Na<sup>f</sup>/pUFR027, *X. campestris* pv. manihotis 289Na<sup>f</sup>/73 e *X. campestris* pv. vesicatoria

317 foram crescidas em meio NYGB por 16 horas. Aproximadamente 1,5 ml destas culturas foram centrifugadas em tubos de microcentrífugas por 2 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em 180 µl de tampão de lise. por 20 mg de sedimento.

Tampão de lise:

0.6 mM Tris-HCl, pH 6.8

5% β-Mercaptoetanol

10% glicerol

2.8% de SDS

Esta solução foi deixada no banho a 100°C por 10 minutos. Em seguida centrifugou-se a solução por 3 minutos a 12000 rpm e recuperou-se o sobrenadante que foi aplicado no gel de acrilamida para a separação das proteínas por eletroforese.

#### **I-1.5.8.2 - Gel de proteínas**

Gel de resolução 10%

Acrilamida:Bis-acrilamida (30:0.8, V:V)	5.0 ml
Tris-HCl 1M, pH 8.8	5.9 ml
Água	3.6 ml
TEMED	20.0 µl
SDS 10 %	150.0 µl
Persulfato de amônio 0.1M	750.0 µl

### 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%	75.0 µl
TEMED	20.0 µl
Persulfato de amônio 0.1M	0.35 ml

Para a eletroforese utilizou-se tampão de corrida contendo 3 g Tris base, 14.4 g glicina, 1 g de SDS e água destilada q.s.p. 1000 ml.

Depois de aplicadas as amostras , o gel foi submetido a eletroforese a 70 V durante uma hora para que as amostras passassem pelo gel de empacotamento (1,5 cm de comprimento) e em seguida a 140 V por 3 horas (tempo que o tampão de amostra levou para atravessar os 8 cm de comprimento do gel de resolução).

A coloração do gel de proteína foi realizada com prata (Blum *et al.*, 1987). Após a eletroforese o gel foi fixado durante 48 horas numa solução contendo 50% de etanol comercial, 12% de ácido acético e 75 µl de formaldeído para cada 100 ml de solução. Após a fixação, o gel foi lavado 3 vezes por 20 minutos cada, em etanol 50%. Em seguida o gel foi submergido numa solução de tiosulfato de sódio (20 mg/100 ml de água) durante um minuto sob agitação. Logo após, lavou-se o gel durante 20 segundos por 3 vezes com água destilada. O gel foi transferido para uma solução contendo 0.2% de nitrato de prata e 75 µl de formaldeído para cada 100ml de solução e deixado sob agitação por 20 minutos. Para retirar o excesso de nitrato de prata, o gel foi lavado 3 vezes por 20 segundos cada com água destilada. A revelação foi realizada em seguida utilizando-se 6g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2ml de tiosulfato de sódio 0.02 % , 50 µl de formaldeído e água q.s.p. 100 ml.

O tempo na solução reveladora foi variável em função da quantidade de proteínas no gel. Para bloquear a revelação, o gel foi lavado com água e colocado em solução fixadora (50% etanol, 12% ácido acético e 75  $\mu$ l de formaldeído para cada 100 ml de solução).

## I-2 - RESULTADOS

### I - 2.1 - Seleção do clone 289NaI<sup>f</sup>/73

Quatro clones que apresentavam compatibilidade em tomate foram isolados por Marques (1992) através de cruzamento da linhagem *X. campestris* pv. *manihotis* 289NaI<sup>f</sup> com banco genômico da linhagem *X. campestris* pv. *vesicatoria* 317. Estes quatro clones apresentaram os plasmídios denominados pVM51, pVM71, pVM73 e pVM74 com insertos de 3 kb, 2.2 kb, 2.2 kb e 6 kb, respectivamente.

Dando continuidade ao trabalho de Marques (1992), os quatro clones foram caracterizados preliminarmente quanto à patogenicidade em tomate usando-se os testes de sementes e hipocótilos. Nestes testes usou-se como controle positivo e negativo as linhagens 317 e 289NaI<sup>f</sup>, respectivamente. No teste de sementes, os 4 clones 289NaI<sup>f</sup>/51, 289NaI<sup>f</sup>/71, 289NaI<sup>f</sup>/73 e 289NaI<sup>f</sup>/74 apresentaram 60, 50, 60 e 36.7% de plântulas com sintomas atípicos de patogenicidade, respectivamente, num total de 30 sementes testadas para cada linhagem. Estes sintomas caracterizaram-se por amarelamento das folhas e em alguns casos a necrose total da plântula. O sintoma típico de patogenicidade é um enegrecimento das folhas que se tornam úmidas e que se espalha comprometendo toda a plântula. Os controles positivo e negativo apresentaram respectivamente 90 e 30% de plântulas com sintomas.

No teste em hipocótilos, as linhagens 289NaI<sup>f</sup>/51, 289NaI<sup>f</sup>/71, 289NaI<sup>f</sup>/73 e 289NaI<sup>f</sup>/74 apresentaram sintomas de doença em 60, 20, 66 e 13% dentre 50 hipocótilos enquanto os controles positivo (317) e negativo (289NaI<sup>f</sup>) apresentaram 100 e 36% de hipocótilos com sintomas da doença, respectivamente. Como os resultados obtidos com a linhagem 289NaI<sup>f</sup>/73, que contém clonado o fragmento de 2.2 kb de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, foram mais próximos ao da linhagem patogênica 317, decidiu-se caracterizá-lo melhor através de outros experimentos descritos a seguir.

## **I -2.2- Caracterização do clone 289NaI<sup>f</sup>/73**

### **I-2.2.1 - Patogenicidade em hospedeiros de *X. campestris* pv. vesicatoria**

#### **I-2.2.1.1 - Teste em tomate**

Tomate e pimentão são os hospedeiros de *X. campestris* pv. vesicatoria e não são compatíveis com a linhagem 289NaI<sup>f</sup> de *X. campestris* pv. manihotis. No entanto testes preliminares descritos acima e obtidos por Marques (1992) mostraram que o clone 289NaI<sup>f</sup>/73 apresentou-se compatível com este novo hospedeiro. Para uma melhor caracterização deste recombinante, foram realizados outros testes. Em todos os testes realizados em tomate usou-se como controle positivo a linhagem 317 e como negativo a linhagem 289NaI<sup>f</sup>/pUFR027. Usou-se a linhagem 289NaI<sup>f</sup>/pUFR027 como controle negativo para se excluir um possível envolvimento do vetor pUFR027 na patogenicidade.

Através do teste em sementes pôde-se avaliar o comportamento do clone 289NaI<sup>f</sup>/73 em plântulas de tomate. Foi realizada contagem do número de bactérias nas plântulas em intervalos de 24 horas desde o dia em que as plântulas originadas de sementes tratadas com o controle positivo (317) começaram a apresentar sintomas de patogenicidade (9<sup>o</sup> dia) até o 13<sup>o</sup> dia quando as plântulas deste mesmo grupo apresentaram-se completamente necrosadas. Embora os sintomas tenham sido atípicos nas plântulas tratadas com a linhagem 289NaI<sup>f</sup>/73, o número de células que se desenvolveram nestas plântulas foi significativamente superior ao da linhagem 289NaI<sup>f</sup>/pUFR027 (controle negativo) durante todo o período amostrado. O clone 289NaI<sup>f</sup>/73 apresentou uma taxa de crescimento intermediária, com diferenças significativas, entre os controles positivo (317) e negativo (Figura 3).

No teste de inoculação das bactérias em plântulas, os sintomas de patogenicidade apareceram a partir de 72 horas como no controle positivo, porém, o número de plântulas afetadas por 289NaI<sup>f</sup>/73, em relação ao controle positivo foi baixo. Foram testadas 30 plântulas para cada linhagem. Apenas 22.3% das plântulas inoculadas com 289NaI<sup>f</sup>/73 apresentaram sintomas de patogenicidade enquanto os controles positivos e negativos apresentaram, respectivamente, 95% e 5%. As diferenças observadas entre as plântulas

UFC/plântula

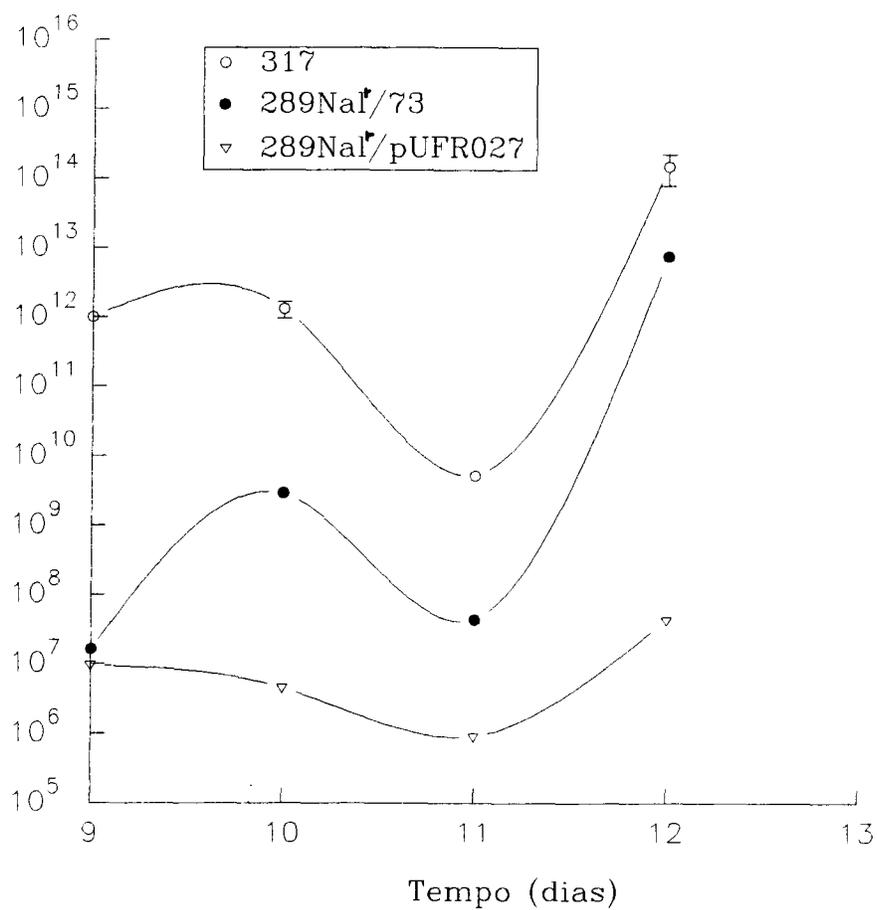


Figura 3 - Unidades formadoras de colônias (UFC) por plântula de tomate após 9 dias do tratamento das sementes com suspensão bacteriana (teste em sementes). As linhagens testadas foram: 317 (controle positivo), 289NaI<sup>r</sup>/73 e 289NaI<sup>r</sup>/pUFR027 (controle negativo).

infectadas com a linhagem 289NaI<sup>f</sup>/73 e a linhagem 289NaI<sup>f</sup>/pUFR027 foram muito sutis dificultando a análise dos resultados.

Pelo teste em hipocótilos de tomate (descrito no item I-1.4.4) observou-se uma resposta bastante distinta entre o controle negativo e a linhagem 289NaI<sup>f</sup>/73. O controle negativo apresentou uma porcentagem de hipocótilos com sintomas muito menor que a linhagem 289NaI<sup>f</sup>/73 (resultados descritos acima no item 2.1). Esta resposta, considerada positiva, foi caracterizada por um crescimento bacteriano em torno do hipocótilo, chegando a cobri-lo; os hipocótilos ficaram escuros e moles. Embora os resultados tenham sido bastante distintos à observação, quando realizada a contagem do número de bactérias por hipocótilo (Figura 4), observou-se pouca diferença entre o clone 289NaI<sup>f</sup>/73 e o controle negativo. Durante todo período amostrado o clone 289NaI<sup>f</sup>/73 mostrou-se bastante diferente em termos quantitativos do controle positivo (317). Em relação ao controle negativo (289NaI<sup>f</sup>/pUFR027) não houve diferença significativa na maior parte do tempo amostrado, chegando mesmo a igualar o número de bactéria por plântula no final da amostragem (4<sup>o</sup> dia).

Usando-se folhas de tomate adulto ( teste descrito no item I-1.4.5 ), a linhagem 289NaI<sup>f</sup>/73 apresentou uma resposta típica de patogenicidade. Esta resposta apareceu após 48 horas como uma lesão úmida e escura que foi se espalhando pelo tecido foliar, chegando em alguns casos a comprometer o pecíolo da folha. Foi uma resposta similar à do controle positivo. As folhas inoculadas com a linhagem 289NaI<sup>f</sup>/pUFR027 (controle negativo) apresentaram uma resposta de hipersensibilidade, porém tardia. Após 72 horas iniciou-se esta resposta que se caracterizou por uma mancha escura com bordas amareladas na região do inóculo. Estas manchas não se espalharam e eram secas (Figura 5).

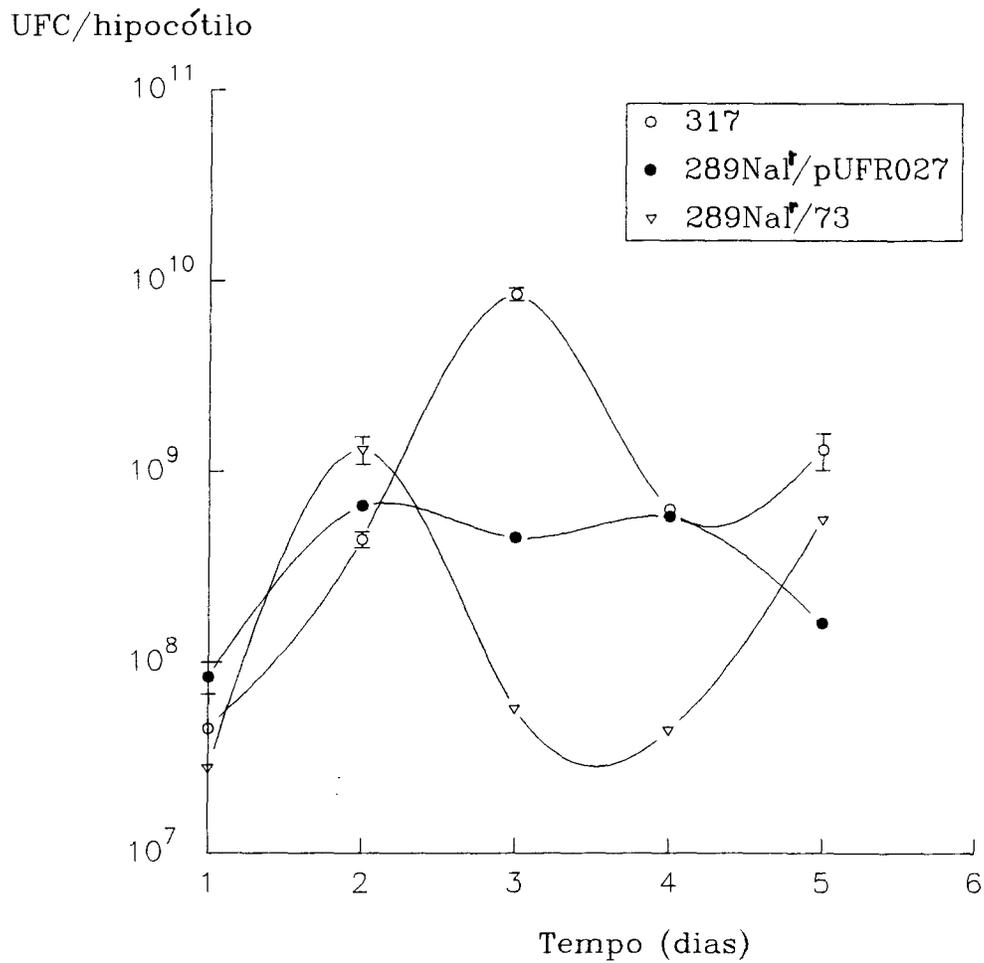


Figura 4 - Unidades formadoras de colônia (UFC) por hipocótilo de tomate (teste em hipocótilos). As linhagens testadas foram: 289NaI/73, 317 (controle positivo) e 289NaI<sup>r</sup>/pUFR027 (controle negativo).

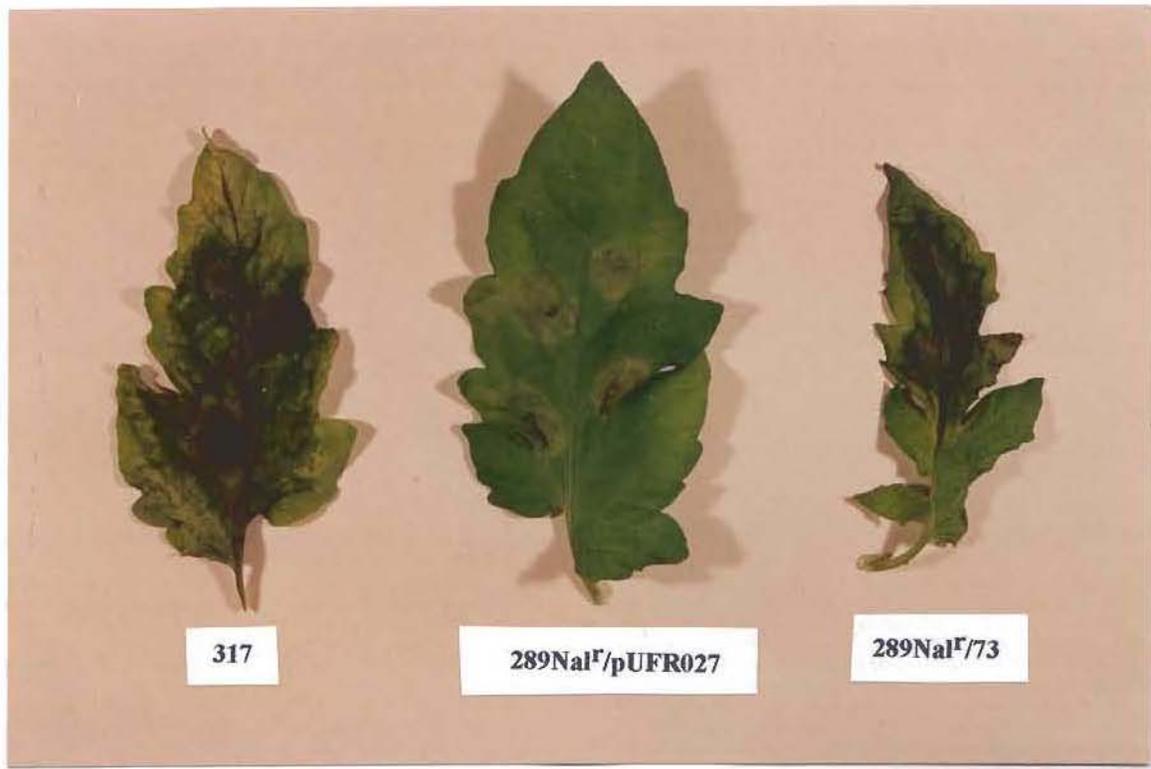


Figura 5 - Folhas de tomate após 5 dias da inoculação com as linhagens *X. campestris* pv. vesicatoria 317 (controle positivo), *X. campestris* pv. manihotis 289Nal<sup>r</sup>/pUFR027 (controle negativo) e *X. campestris* pv. manihotis 289Nal<sup>r</sup>/73.

### I-2.2.1.2 - Teste em pimentão

Em pimentão, outro hospedeiro de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, tanto em plântulas (Figura 6) como em sementes e folhas, não foram observadas respostas de patogenicidade com a linhagem 289Nal/73. Todas as plântulas, sementes e folhas inoculadas com esta linhagem e com o controle negativo (289Nal/pUFR027) apresentaram-se sadias ao final da avaliação. Mesmo a linhagem 317 apresentou-se avirulenta para este hospedeiro. Por essa razão, usou-se como controle positivo para estes testes a linhagem *X. campestris* pv. *vesicatoria* 479, patogênica para tomate e pimentão. O controle positivo apresentou 75% de plântulas afetadas no teste em plântulas e em sementes 81%. No teste de inoculação das bactérias em plântulas, os sintomas de patogenicidade, apresentados pela linhagem *X. campestris* pv. *vesicatoria* 479Nal<sup>f</sup>, caracterizaram-se por necrose que se iniciou pelas folhas da plântula e se espalhou por todo o hipocótilo. O início da resposta ocorreu três dias após a inoculação e após 5 dias a plântula apresentou-se totalmente necrosada, úmida com aspecto translúcido. No teste em sementes, os sintomas de patogenicidade apareceram após 12 dias do tratamento das sementes e iniciavam com manchas escuras na superfície abaxial das folhas das plântulas. Esta resposta progrediu e se espalhou por toda a plântula e no 15<sup>o</sup> dia estavam completamente necrosadas e úmidas.

Em folhas de pimentão, a linhagem 289Nal<sup>f</sup>/73 apresentou apenas uma resposta limitada à região do inóculo, seca, como a resposta apresentada em decorrência da linhagem 289Nal<sup>f</sup>/pUFR027 (controle negativo). Essa resposta apareceu após 48 horas do inóculo. As folhas inoculadas com o controle positivo (479) apresentaram sintomas típicos de patogenicidade. A resposta apareceu após 48 horas, eram inicialmente manchas escuras, muito úmidas e que se espalharam rapidamente além da região inoculada comprometendo todo o tecido foliar.

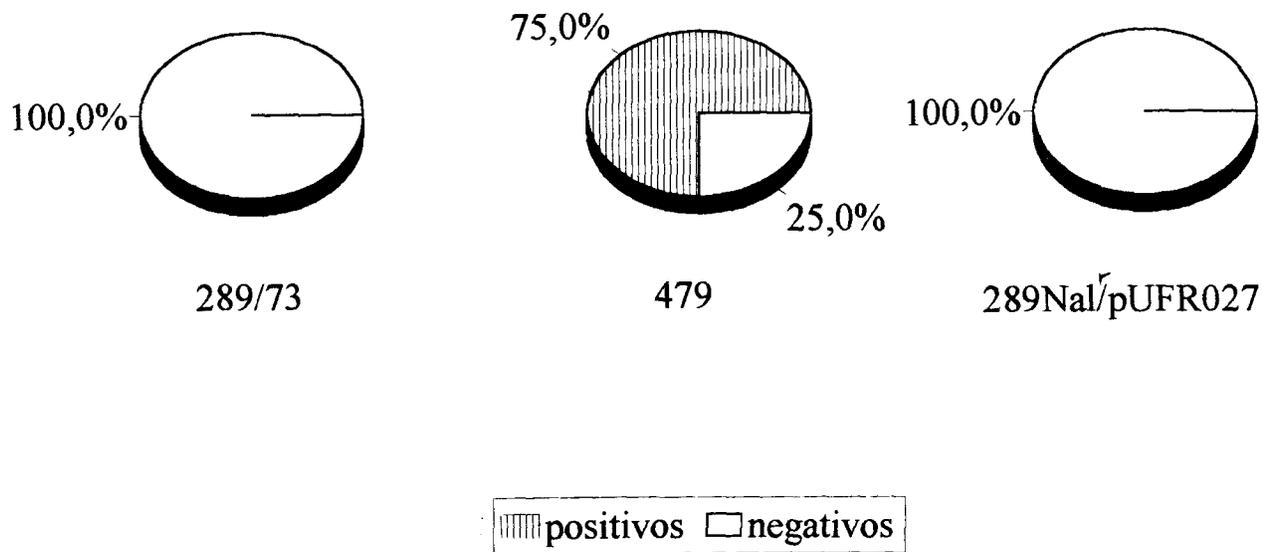


Figura 6 - Teste em plântulas de pimentão após 5 dias da inoculação. As linhagens testadas foram: 289Nal/73, 479 (controle positivo) e 289Nal<sup>r</sup>/pUFR027 (controle negativo).

### **I-2.2.2 -Indução de hipersensibilidade em planta não hospedeira**

Folhas de tabaco, não hospedeiro de *X. campestris* pv. *vesicatoria* nem de *X. campestris* pv. *manihotis*, foram inoculadas com a linhagem 289NaI<sup>f</sup>/73 para testar possível diferença na capacidade deste clone e da linhagem 289NaI<sup>f</sup>/pUFR027 em induzir resposta de hipersensibilidade em plantas não hospedeiras. Este teste mostrou claramente que tanto a linhagem 289NaI<sup>f</sup>/73 quanto a 289NaI<sup>f</sup>/pUFR027 são capazes de induzir respostas semelhantes de hipersensibilidade nessa planta. A resposta apareceu após 72 horas do inóculo. Eram lesões escuras, com bordas amarelas, localizadas e secas (Figura 7).

### **I-2.2.3. - Patogenicidade em feijão e mandioca**

A linhagem 289NaI<sup>f</sup>/73 poderia estar apresentando modificações de respostas em tomate devido a uma superexpressão de genes de patogenicidade. Para testar tal hipótese decidiu-se introduzir o plasmídeo pVM73 em uma outra linhagem de *X. campestris* e testá-la em seu hospedeiro natural. Caso estivesse envolvida uma superexpressão de genes de patogenicidade esperaria-se uma resposta de patogenicidade diferente da linhagem selvagem ao menos a nível de intensidade da resposta. A linhagem *X. campestris* pv. *phaseoli* 558 (patógeno de feijão, *Phaseolus vulgaris*) foi transformada com o plasmídeo pVM73 através de eletrotransformação. O recombinante contendo este plasmídeo foi designado 558/73 e foi usado para teste de patogenicidade em folhas de feijão. Usou-se como controles positivo e negativo a linhagem 558 e 317, respectivamente. Neste teste foram inoculadas suspensões com diferentes concentrações de bactéria. Infiltrou-se aproximadamente 50 µl de soluções com absorbância, medida à 600 nm, igual a 0.3 e 0.5, ajustadas com solução de NaCl 0.9%. As linhagens 558 e 558/73 não apresentaram diferenças observáveis em nenhuma das concentrações. Após três dias de inóculo, nas áreas inoculadas com concentração maior do controle positivo (558) e do recombinante 558/73 iniciou-se uma resposta que se caracterizou por pequenas manchas escuras. Estas manchas foram se espalhando e coalescendo. Após uma semana grande parte da folha já apresentou sintoma de

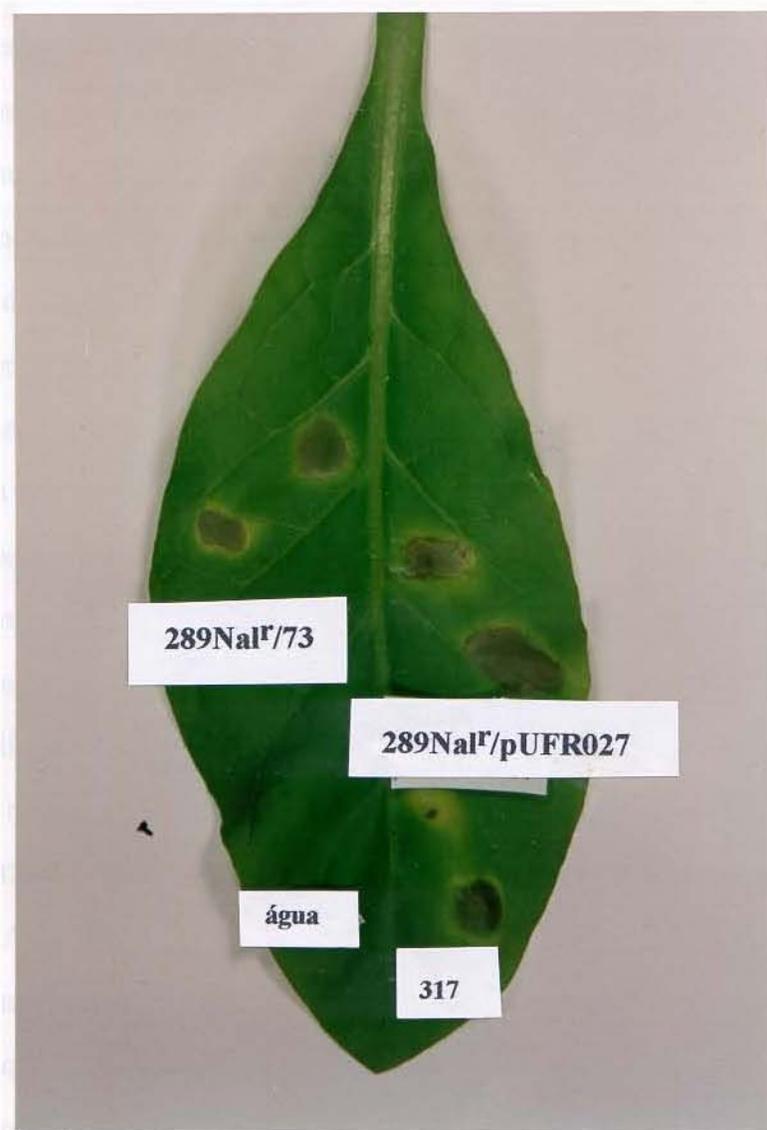


Figura 7 - Folha de tabaco após 72 horas de inoculação com suspensões bacterianas das linhagens *X. campestris* pv. manihotis 289Nal<sup>r</sup>/pUFR027, 289Nal<sup>r</sup>/73, *X. campestris* pv. vesicatoria 317 e água

patogenicidade (manchas escuras, porém não muito úmidas como em tomate). Estes sintomas comprometeram áreas além da região inoculada, no entanto, após uma semana não se observou mais nenhum progresso desta resposta. Nas áreas inoculadas com concentrações menores de 558 e 558/73, as respostas foram semelhantes, porém, retardadas em relação aos inóculos mais concentrados. Os sintomas de patogenicidade apareceram após 5 dias e progrediram mais lentamente, chegando a apresentar aparência semelhante aos inóculos mais concentrados após 10 dias. O controle negativo, 317, apresentou apenas uma leve clorose com pequenas manchas escuras que não coalesceram. Esta resposta foi apresentada após a inoculação e não progrediu.

Outro experimento semelhante foi realizado com a linhagem 289Nal<sup>f</sup> de *X. campestris* pv. *manihotis*, patogênica para mandioca. Procurou-se verificar se a introdução do fragmento de DNA relacionado com patogenicidade e originado de banco de outro patovar (plasmídeo pVM73) alterava a capacidade de interação da linhagem 289Nal<sup>f</sup> com seu hospedeiro natural. Em folhas de mandioca, todas as linhagens derivadas da 289 (289Nal<sup>f</sup>/pUFR027, controle positivo e 289Nal<sup>f</sup>/73) apresentaram respostas semelhantes de patogenicidade. A "mancha angular", resposta típica de patogenicidade por *X. campestris* pv. *manihotis* neste hospedeiro, foi observada a partir de 48 horas. Trata-se de uma mancha escura e úmida que por acompanhar o sistema vascular das folhas apresenta um aspecto angular. O controle negativo (317) apresentou uma resposta típica de hipersensibilidade após 24 horas de inoculação: uma resposta seca e restrita à região do inóculo (Figura 8).

### **I-2.3 - Caracterização do plasmídeo pVM73 em outros patovares de *X. campestris***

Como foi visto acima nos testes em tomate com o clone 289Nal<sup>f</sup>/73, a introdução do plasmídeo pVM73 na linhagem 289Nal<sup>f</sup> de *X. campestris* pv. *manihotis*, resultou numa compatibilidade desta linhagem com um novo hospedeiro, tomate. Decidiu-se a partir destes resultados, introduzir este plasmídeo em outros patovares de *X. campestris* não compatíveis

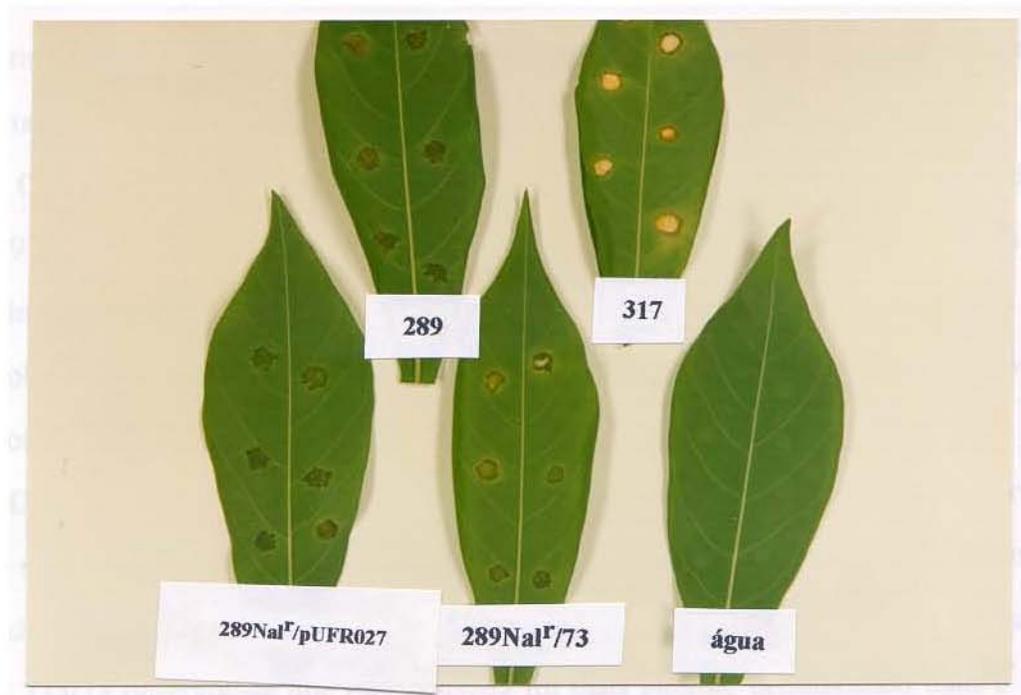


Figura 8 - Folhas de mandioca após 7 dias de infiltração com as linhagens *X. campestris* pv. vesicatoria 317, *X. campestris* pv. manihotis 289, 289Nal<sup>F</sup>/pUFR027, 289Nal<sup>F</sup>/73 e água.

com tomate e verificar possíveis alterações com relação à compatibilidade neste hospedeiro. Decidiu-se utilizar as linhagens *X. campestris* pv. *glycines* 333Sp<sup>r</sup> (compatível com soja), *X. campestris* pv. *citri* 223 (compatível com cítricos) e *X. campestris* pv. *phaseoli* 558 (compatível com feijão), todas não compatíveis com tomate. Através de eletroporação introduziu-se o plasmídeo pVM73 extraído da linhagem 289NaI<sup>r</sup>/73 nestas linhagens. O comportamento da linhagem recombinante 333/73 foi testada em sementes e folhas de tomate. Os resultados do teste em sementes de tomate com este patovar são apresentados na Figura 9. Observa-se pouca diferença entre as linhagens 333Sp<sup>r</sup> (controle negativo) e o recombinante 333/73. Raras plântulas apresentaram sintomas de patogenicidade e estas foram observadas numa mesma frequência entre o recombinante 333/73 e o controle negativo(333Sp<sup>r</sup>), apenas 12.5% dentre as 40 sementes testadas para cada linhagem.

Observou-se que estas duas linhagens apresentaram nos testes em folhas uma reação atípica, nem de hipersensibilidade nem de patogenicidade. A princípio, apresentaram uma reação de patogenicidade, no entanto os sintomas não progrediram. Nas folhas tratadas com o clone 333/73 observou-se que esta resposta foi mais intensa, prejudicando mais a folha. Não sendo, entretanto, idêntica àquela do controle positivo (317).

Os recombinantes derivados das linhagens *X. campestris* pv. *citri* 223 (223/73) e *X. campestris* pv. *phaseoli* 558 (558/73) foram testados apenas em folhas de tomate.

A linhagem *X. campestris* pv. *citri* 223/73apresentou uma resposta atípica caracterizada por forte clorose em torno da região inoculada. O inóculo, úmido e escuro, se propagou atingindo halos de cerca de três vezes do seu tamanho inicial. Esta resposta iniciou após 48 horas da inoculação. Na linhagem selvagem *X. campestris* pv. *citri* 223 observou-se uma resposta semelhante a hipersensibilidade que também apareceu após 48 horas da inoculação, porém, não se propagou e apresentou uma leve clorose em torno da região inoculada (Figura 10).

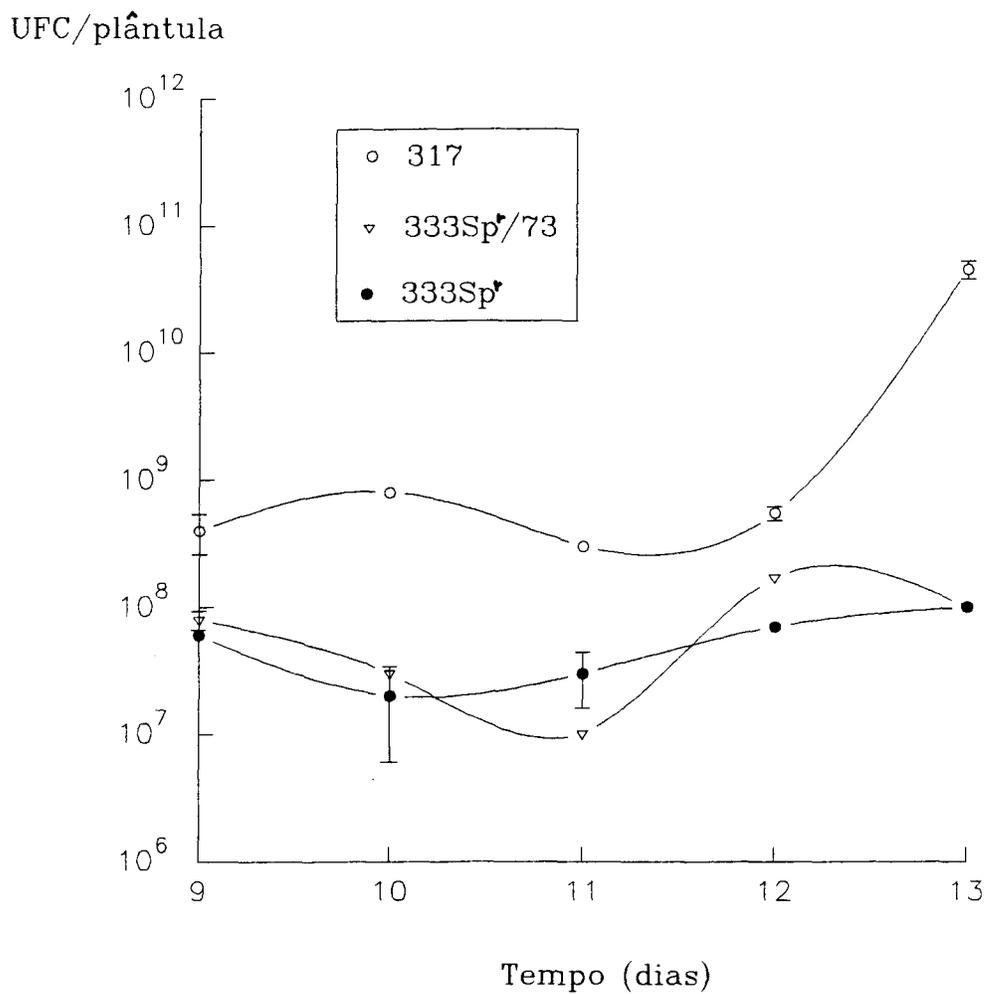


Figura 9 - Unidades formadoras de colônia (UFC) por plântula de tomate após 9 dias de tratamento das sementes com suspensões bacterianas (teste em sementes). As linhagens testadas foram: 317 (controle positivo), 333Sp<sup>r</sup> (controle negativo) e 333Sp<sup>r</sup>/73.



Figura 10 - Folha de tomate após 7 dias da inoculação das linhagens *X. campestris* pv. citri 223 e *X. campestris* pv. citri 223/73.

Resultados similares foram observados entre as linhagens *X. campestris* pv. *phaseoli* 558 e o clone 558/73. Ambas as linhagens apresentaram apenas uma resposta localizada à região do inóculo, seca e com leve clorose ao redor.

#### **I-2.4 - Hibridização de DNA total de diferentes patovares de *Xanthomonas* e de *Pseudomonas* com o fragmento *EcoRI* de 2.2 kb**

DNA total das linhagens de *X. campestris* pv. *vesicatoria* 317, 479, 401, 411 e 484; *X. campestris* pv. *phaseoli* 558; *X. campestris* pv. *manihotis* 289; *X. campestris* pv. *glycines* 333; *X. campestris* pv. *campestris* Ca110; *X. campestris* pv. *citri* 223 e *P. chicorii* 1053, foram digeridos com *EcoRI* e transferidos para membrana de náilon. O fragmento *EcoRI* de 2.2 kb do plasmídeo pVM73 foi marcado não radioativamente com digoxigenina e usado como sonda para hibridizar a membrana de náilon com o DNA das diferentes linhagens bacterianas. O objetivo desta hibridização foi detectar possível homologia deste fragmento em diferentes patovares de *X. campestris* e também em outro gênero relacionado (*Pseudomonas*). Observou-se que todas as linhagens de *X. campestris* pv. *vesicatoria* apresentaram homologia em Southern quando hibridizados com o fragmento *EcoRI* de 2.2 kb marcado e as bandas obtidas desta hibridização apresentaram polimorfismo (figura 11). No DNA da linhagem *X. campestris* pv. *vesicatoria* 317 foi observada uma banda de hibridização de 2.2 kb. Nas linhagens 479,401, 411 deste mesmo patovar foram observadas uma banda de hibridização de aproximadamente 9 kb e na linhagem *X. campestris* pv. *vesicatoria* 484 observou-se uma banda maior que 12 kb. As linhagens de *X. campestris* pv. *glycines* 333 e *X. campestris* pv. *citri* 223 apresentaram apenas uma banda de aproximadamente 9 kb. Na linhagem de *X. campestris* pv. *campestris* Ca110 foi observada uma banda maior que 12 kb. *X. campestris* pv. *phaseoli* 558 apresentou duas bandas de hibridização, uma de aproximadamente 2.2 kb e outra de 12 kb, porém com baixa homologia. A linhagem de *X. campestris* pv. *manihotis* 289 apresentou apenas uma banda de

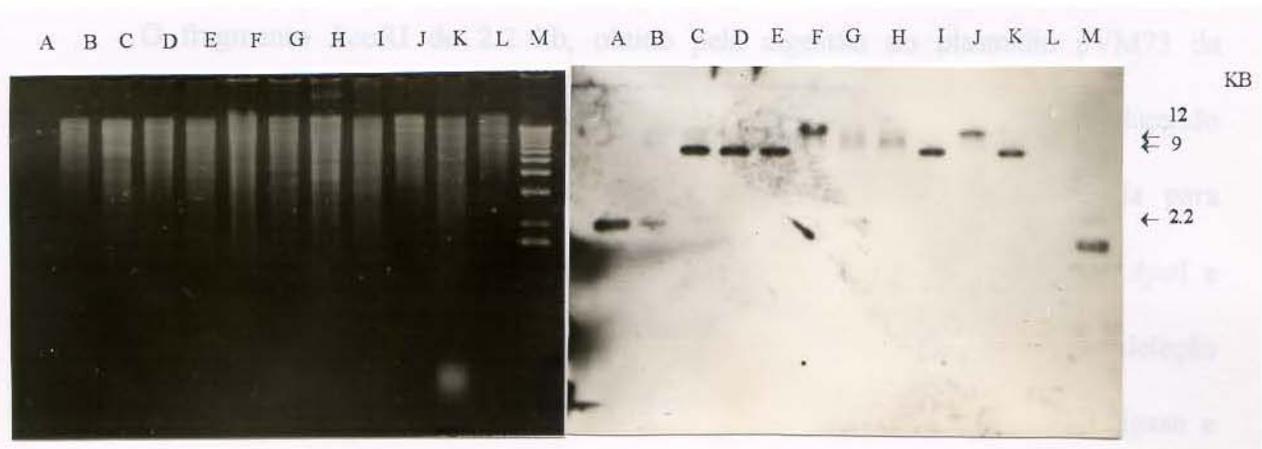


Figura 11 - (I) Eletroforese em gel de agarose 0.8% de DNA total digeridos com *EcoRI* das linhagens de *X. campestris* pv. vesicatoria 317 (B), 479 (C), 401 (D), 411 (E), 484 (F), *X. campestris* pv. phaseoli 558 (G), *X. campestris* pv. manihotis 289 (H), *X. campestris* pv. glycines 333 (I), *X. campestris* pv. campestris Ca110 (J), *X. campestris* pv. citri 223 (K), de *P. chicorii* 1053 (L) e do fragmento *EcoRI* de 2.2 kb do plasmídeo pVM73 (A); (M) Marcador de peso molecular (ladder 1kb, Gibco BRL). (II) Hibridização com o inserto *EcoRI* de 2.2 kb marcado com digoxigenina.

aproximadamente 12 kb com baixa homologia. O DNA da linhagem de *P. chicorii* 1053 não apresentou homologia com esta sonda.

### **I-2.5 - Deleção unidirecional do pK73 e sequenciamento**

O fragmento *EcoRI* de 2.2 kb, obtido pela digestão do plasmídeo pVM73 da linhagem 289Nal<sup>r</sup>/73 com *EcoRI*, foi ligado ao vetor pBluescriptI<sup>r</sup>KS+ (Figura 2), digerido com a mesma enzima. A nova construção foi denominada pK73 e foi usada para eletrotransformar *E. coli* DH5 $\alpha$ . O plasmídeo pK73 foi extraído e digerido com *ApaI* e *HindIII* para posterior deleção unidirecional com *ExoIII*. Os produtos da deleção unidirecional do pK73 com a enzima *ExoIII* foram recircularizados com DNA ligase e utilizados para transformar a linhagem de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Foram isolados 14 clones que compreenderam 100% do fragmento de 2.2 kb para serem sequenciados (Figura 12). O resultado do sequenciamento é apresentado na figura 13

O fragmento *EcoRI* apresentou 2212 pares de bases. Nele foram encontradas dois possíveis quadros de leitura (“ORFs”) numa fita: uma entre os nucleotídios 399 e 1109 (ORF1) e o outro entre 1310 e 1942 (ORF2) e um outro menor, na outra fita numa das extremidades do fragmento, entre os nucleotídios 2197 e 1887 (ORF3).

Uma análise mais minuciosa destes possíveis quadros de leitura foi realizada na tentativa de se identificar regiões promotoras. Para a ORF1, foi localizada uma região possível RBS (sequência de Shine-Dalgarno, denominada RBS1, sublinhada), uma provável sequência -10 entre 373 e 383 e uma -35 entre 353 e 359. Para a ORF2 uma possível região RBS (RBS2, sublinhada) está entre o nucleotídeo 1300 e 1304. A provável região -10 está

entre 1290 e 1296 e a região -35 entre 1271 e 1275. Uma vez que a ORF3 se encontra na extremidade do fragmento não foi possível detectar uma região promotora.

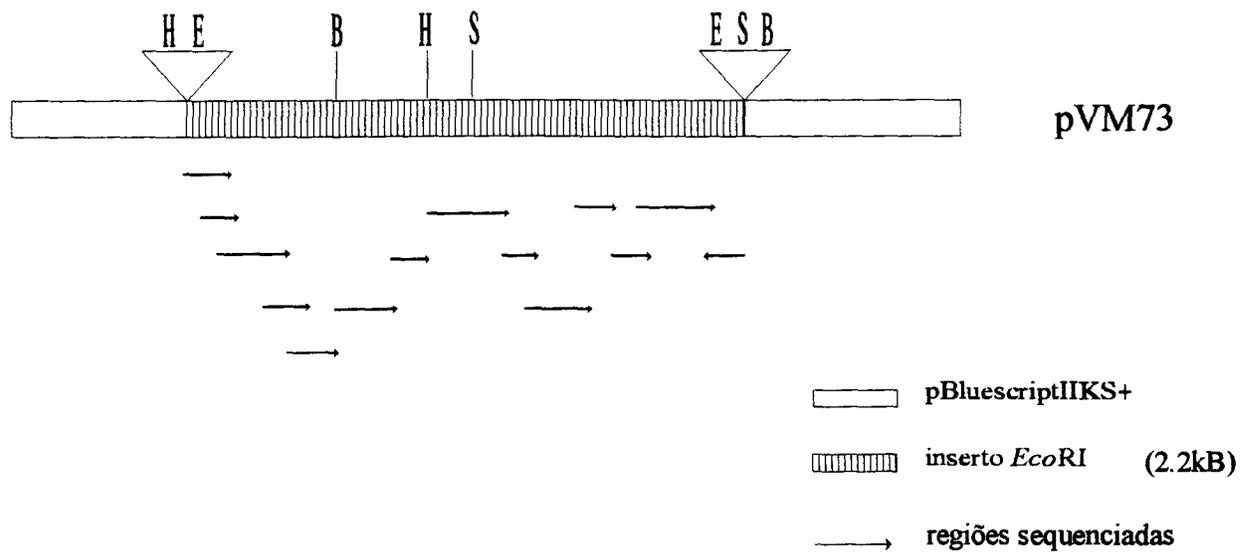


Figura 12 - Representação esquemática do plasmídeo pVM73 contendo o inserto *EcoRI* de 2.2 kb. As setas abaixo representam as regiões sequenciadas e as letras acima representam os sítios para enzimas de restrição que são: H) *HincII*; E) *EcoRI*; B) *BamHI* e S) *SmaI*.

```

1 GAATTCGGTT GTTCCACCGG TAGCATTCCA GAGCTTGTGT CGAGAAGATC
CTTAAGCCAA CAAGGTGGCC ATCGTAAGGT CTCGAACACA GCTCTTCTAG

51 GGGCCCAGCA GGCCTCGTC GCCGATGCAT CGCGGCGCTC GGCGGGCGAT
CCC GGTCGT CCGCGAGCAG CGGCTACGTA GCGCCGCGAG CCGCCCGCTA

101 GTAGCCCACC TTCCAGCCGA CCACCTGGTC GTCCCCTGG CTGATGGCGA
CATCGGGTGG AAGGTCGGCT GGTGGACCAG CAGGGTGACC GACTACCGCT

151 TATCCTCGCA CCTGGTAGGC GGTGAGCAGG ATCGTCGGGG ATCTGCCCTG
ATAGGAGCGT GGACCATCCG CCACTCGTCC TAGCAGCCCC TAGACGGGAC

201 GAAAGTCCGT GCAGCGAGGC CCTGCCGATC CGGCGATCTC GTCCACAAAG
CTTTCAGGCA CGTCGCTCCG GGACGGCTAG GCCGCTAGAG CAGGTGTTTC

251 CCGCTGGGCA TCTCACACGA GGATGTGGAG GATGGTGGGG TGGCCGGCGT
GGCGACCCGT AGAGTGTGCT CCTACACCTC CTACCACCCC ACCGGCCGCA

301 CGTTCGTTGC CTCAAGGGTG TCTCCTGATA GGTGTTTTTG TTGCACTGCC
GCAAGCAACG GAGTTCACAG AGAGGACTAT CCACAAAAC AACGTGACGG

351 AAATCGACAGT GGCACGTGCT GTTATATGGT AAACCGGTGT CATTGGCAAT
TTAGCTGTCA CCGTGCACGA CAATATACCA TTTGGCCACA GTAACCGTTA

401 GTGCAGGATC GGCAAACTG GCCGCAGGAA CAAGGCAAAC CCTGTGGGAG
CACGTCCTAG CCGTTTTGAC CGGCGTCCTT GTTCCGTTTG GGACACCCTC

451 GGGTGGATGG AACAGACAGA CAAGCCCAGA CGGGATCTTG TTTGCCGGAT
CCCACCTACC TTGTCTGTCT GTTCGGGTCT GCCCTAGAAC AAACGGCCTA

501 CTTTTCGAGA CTCATGCGCC AGTGCATGAC GGTGGTGGTG ATGGTGGGAG
GAAAAGCTCT GAGTACGCGG TCACGTA CTG CCACCACCAC TACCACCCTC

551 GCTGCGCTGG CCGGACCAGT GCTGGGCCGG CCGAGGTGCC CGGCGCCGAT
CGACGCGACC GGCCTGGTCA CGACCCGGCC GGCTCCACGG GCCGCGGCTA

601 ACCGCAGCCG AGCAGGCCAG CCGGATCCTA GGACTAGTGG ATCGCCCGGT
TGGCGTCGGC TCGTCCGGTC GGCCTAGGAT CCTGATCACC TAGCGGGCCA

651 GCGCGTTGCG CGGTTTATGT TGATGACCGG GTAGATCAGC AGCGCAAAT
CGCGCAACGC GCCAAGTACA ACTACTGGCC CATCTAGTCG TCGCGTTTTA

701 CCGGGGGCGC CGCGCCTCAG TGCAGTCCGG GCCGCATCCA CCTTGGGGTA
GGCCCCCGCG GCGCGGAGTC ACGTCAGGCC CGGCGTAGGT GGAACCCCAT

```

Figura 13 - Sequenciamento do fragmento *EcoRI* de 2.2 kb do plasmídio pVM73.

Os sítios de iniciação de transcrição (ATG) de quadros de leituras são apresentados em **negrito**. Possíveis regiões de Shine- Dalgarno (RBS), regiões -10 e -35 apresentam-se sublinhadas e os sítios de terminação de transcrição aparecem em **negrito com asteriscos** acima.

751 GACCTGCGCG GCGTACGGGT GGCCAGGCTG GCGGCGACAT GGGGGCGACG  
CTGGACGCGC CGCATGCCCA CCGTCCGAC CGCCGCTGTA CCCCCGCTGC

801 GAACCCATA CCCCAGCCCG CTGGCGGGTA TGCCGTAACT GGACGACTTG  
CTTGGGGTAT GGGGCTGGGC GACCGCCCAT ACGGCATTGA CCTGCTGAAC

851 GCGCGGATCA GCCGACGCGA CGACTGGTCG CCAGCTTCGT CGACCAGGCC  
CGCGCCTAGT CGGCTGCGCT GCTGACCAGC GGTCGAAGCA GCTGGTCCGG

901 GGCATCACCC TGTTCGTGCT GCGCTACCGC CTGCCCGGCG AAGGCCACCC  
CCGTAGTGGG ACAAGCACGA CGCGATGGCG GACGGGCCGC TTCCGGTGGG

951 GAACGGCGCC CGACGTGCCG CTGGCCGATG CACAGCGTCG CTGCGGCTGA  
CTTGCCCGGG GCTGCACGGC GACCGGCTAC GTGTCGCAGC GACGCCGACT

1001 TCCC GGCCAA TGCTGCCAGT TACGGCATCG ACCCGCAGCA GCGGTGCGCG  
AGGGCCGGTT ACGACGGTCA ATGCCGTAGC TGGGCGTCGT CGCCACGCGC

1051 TCGATGGGGT TCTTCGGCCG GGTGATCGTG AGCCTTGGCA CCCGCTAGTC  
AGCTACCCCA AGAAGCCGGC CCACTAGCAC TCGGAACCGT GGGCGATCAG  
\*\*\*

1101 CGTCCG**TAGG** TCTACCCCAA GGTGGATTGC GGCCGATGAT GAGGCCGTTG  
GCAGGCATCC AGATGGGGTT CCACCTAACG CCGGCTACTA CTCCGGCAAC

1151 CGGATTTTTG TGTGTGATTG TCGGTATGAA TGGAAATGGCA ATGAGCCGGG  
GCCTAAAAAC ACACACTAAC AGCCATACTT ACCTTACCGA TACTCGGCC

1201 TTGCATGCTG TCGGAGAGTC AGCGATTGGA GTGGTGGTAT TTGATGAATG  
AACGTACGAC AGCCTCTCAG TCGCTAACCT CACCACCATA AACTACTTAC

1251 ATTGATGATG ATTGAGTTTT <sup>-35</sup>GGATGAGATA AGCCGCTGCT <sup>-10</sup>GATCTACCCG  
TAACTACTAC TAACTCAAAA CCTACTCTAT TCGGCGACGĀ CTAGATGGGC

1301 <sup>RBS2</sup>GTCATCGACA **TGGACAGCGC** CAACCGGAGC CGGGCCTCCG CGCGCAGCCC  
CAGTAGCTGT ACCTGTGCGG GTTGCCTCG GCCC GGAGGC GCGCGTCGGG

1351 TGCTGGCCCA GCAGTCCAGC CGCTGCGCAG GTGCGTGTGT ATTTCGCCCCGA  
ACGACCGGGT CGTCAGGTCG GCGACGCGTC CACGCACACA TAAGCGGGCT

1401 ACTCGATGTG GATGCACGCA CCCCCTGCCC AGCTTTCTCT GCGATCCGAC  
TGAGCTACAC CTACGTGCGT GGGGGACGGG TCGAAAGAGA CGCTAGGCTG

1451 CGCAGCGGCA GCGCCAGACC GTGGCCGTGG CGCAGCCTGG CGCAGGCTGG  
GCGTCGCCGT CGCGGACTGG CACCGGCACC GCGTCGGACC GCGTCCGACC

1501 ATCGCGCATA TCACCAAGGC ACAGCGCCGG CAGCTGCATC GGGACCGGGC  
TAGCGCGTAT AGTGGTTCCG TGTCGCGGCC GTCGACGTAG CCCTGGCCGC

1551 CCAGGACGTG GCCGATGACA GCCGGTCCAC GCCCGACGTC CGTCCGCCGC  
GGTCCTGCAC CGGCTACTGT CGGCCAGGTG CGGGCTGCAG GCAGGCGGGC

1601 CGACGTCCTG TCCTGGTCGC GGCCTGCTCG CACATGCCGC CGCAGCGCTC  
GCTGCAGGAC AGGACCAGCG CCGGACGAGC GTGTACGGCG GCGTCGCGAG

Figura 13 - Sequenciamento do fragmento *EcoRI* de 2.2 kb do plasmídeo pVM73 (continuação)

1651 CCCGGCTTTC TGGCGCGCCG CATCCCCGCC GCCACCACGC GAGGCCAGCG  
 GGGCCGAAAG ACCGCGCGGC GTAGGGGCGG CGGTGGTGCG CTCCGGTCGC

1701 CGCCTGCTAG GCCGACGCCC TGTGGCGCCG CGGTTATCGC GACCAGGGCA  
 GCGGACGATC CGGCTGCGGG ACACCGCGGC GCCAATAGCG CTGGTCCCCT

1751 TCTGCGTGTT CAAGGGCATC CCGTACCGTA CCGCGGCGCA ACGACCGCCT  
 AGACGCACAA GTTCCCCTAG GGCATGGCAT GGCGCCGCGT TGCTGGCGGA

1801 GGGTAACGTC ACGGACCTAA GTCCAGCTCG ACGGGCTGTT ACGGCCTCAG  
 CCCATTGCAG TGCCTGGATT CAGGTCGAGC TGCCCGACAA TGCCGGAGTC

1851 CCGTTTTTCG CGTAGCGGTC GAGCAGCGTC CTGTTCCATG GCCGTTTTCA  
 GGCAAAGCG GCATCGCCAG CTCGTCGCAG GACAAGGTAC CGGCAAAGT  
 \* \*\*

1901 AACTGGCCCA CTAATTCCAG GCAGCCAACT CGGCATAACT GACTGGTGGT  
 TTGACCGGGT GATTAAGGTC CGTCGGTTGA GCCGTATTGA CTGACCACCA  
 \*\*\*

1951 GGTAGGCTCG TCAAGCTGTG CGCGCGTCGT CGGTCAGTCA TGTGCCCAGC  
 CCATCCGAGC AGTTCGACAC GCGCGCAGCA GCCAGTAGT ACACGGGTCG

2001 GACGCCTCGG CCACCACATC GCGGGCACTA TATCTTGTCC TAGCTTGCAA  
 CTGCGGAGCC GGTGGTGTAG CCGCCGTGAT ATAGAACAGG ATCGAACGTT

2051 CGCGGTAGGG TCGGACCTTC GAATCACCCG GTCACCTTTT GCCGGTACCT  
 GCGCCATCCC AGCCTGGAAG CTTAGTGGGC CAGTGGAAAA CGGCCATGGA

2101 TGTCTTCCGA CGAGCTGGCG ATGCCGCTTT TGCCGACTCC GGCAATTGTC  
 ACAGGACGCT GCTCGACCGC TACGGCGAAA ACGGCTGAGG CCGTTAACAG

2151 GGGCAGCTGG ACCTGAATCC AGGCAACTGC AATGGGTGCG CCAGCATACG  
 CCCGTGACCC TGGACTTAGG TCCGTTGACG TTACCCACGC GGTCGTATG

2201 CGGGCGGAAT TC  
 GCCCGCCTTA AG

Figura 13 - Sequenciamento do fragmento *EcoRI* de 2.2 kb do plasmídeo pVM73  
 (continuação)

Os resultados da comparação destas ORFs 1 e 2 com sequências de nucleotídios dos bancos GenBank e EMBL apresentaram homologia com outras sequências já descritas. A ORF1 apresentou homologia (com 53.2% de identidade e uma sobreposição de 327 bases) com o gene *xpsE* de *X. campestris* pv. *campestris*. Esta homologia foi verificada entre os nucleotídios 675 e 1083. O gene *xpsE* faz parte de um “cluster” de genes envolvidos na secreção de proteínas envolvidas com a patogenicidade desta bactéria (Dums *et al.*, 1991). Esta mesma ORF apresentou-se homóloga (53.1% de identidade e uma sobreposição de 578 bases) também com o gene *pefE* de *X. campestris* pv. *campestris*. A homologia foi detectada entre os nucleotídios 560 e 1190. O gene *pefE* faz parte do “cluster” *pef* também relacionado com a secreção de proteínas.

A ORF2 apresentou homologia com genes de bactérias patogênicas pertencentes às espécies *Bordetella parapertussis* e *B. bronchiseptica*. A homologia desta ORF com o gene *bvgS* de *B. parapertussis* foi de 55% de identidade com uma sobreposição de 472 bases e foi encontrada entre os nucleotídios 1330 e 1840. Com a outra espécie, *B. bronchiseptica*, a homologia com o gene *bvgS* foi de 56.6% de identidade e sobreposição de 384 bases entre os nucleotídios 1412 e 1870. As proteínas codificadas por estes genes *bvgS* são descritas como proteínas sensoras envolvidas na regulação da transcrição de fatores de virulência. Não foi encontrada homologia da ORF3 com nenhuma sequência descrita.

### **I-2.6 - Perfil de proteínas totais**

A análise de proteínas totais, verificadas pela técnica de SDS-PAGE não apresentou diferenças no perfil de proteínas totais das linhagens 289, 289NaI<sup>r</sup>, 289NaI<sup>r</sup>/pUFR027 e 289NaI<sup>r</sup>/73 (Figura 14). Também não foi encontrada nenhuma banda exclusiva da linhagem 317 no clone 289NaI<sup>r</sup>/73 (clone obtido do cruzamento da linhagem 289NaI<sup>r</sup> com banco genômico da linhagem 317).

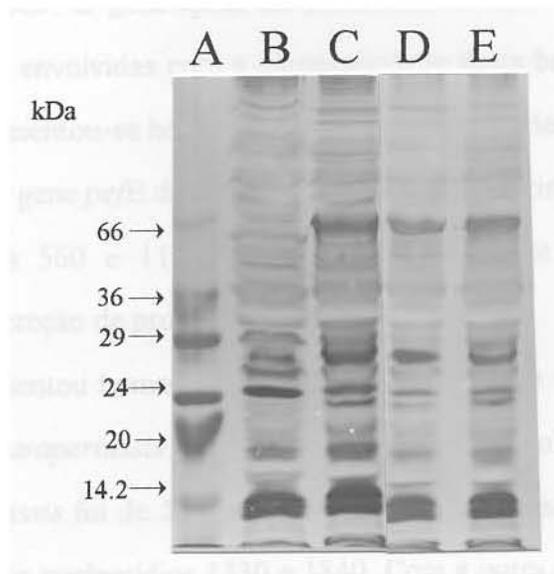


Figura 14 - Eletroforese de proteínas totais de *X. campestris*. (A) marcador de peso molecular; (B) *X. campestris* pv. vesicatoria 317, (C) 289Nal<sup>f</sup>/73;(D) *X. campestris* pv. manihotis 289, (E) 289Nal<sup>f</sup>/pUFR027.

### I - 3 - DISCUSSÃO

O clone 289NaI<sup>f</sup>/73 apresentou compatibilidade com um novo hospedeiro (tomate) sugerindo que determinantes de especificidade do tipo *hsv* para tomate podem ter sido clonados. Para se excluir a possibilidade de que os outros genes de patogenicidade estivessem envolvidos, foram realizados testes em diferentes hospedeiros. Em todos os testes usou-se como controle negativo a linhagem 289NaI<sup>f</sup> com o vetor pUFR027 para se excluir qualquer efeito que este vetor pudesse apresentar nos diferentes hospedeiros. Sabe-se que a introdução de plasmídios de determinados grupos de incompatibilidade numa bactéria fitopatogênica pode alterar suas características de patogenicidade (Moulton *et al.*, 1993). Estes autores observaram que em *P. syringae* pv. *pisi* a introdução de determinados replicons pode levar a um rearranjo de plasmídios e como consequência uma avirulência da bactéria.

Os genes de patogenicidade de *Xanthomonas* são classificados, de forma geral, em quatro grupos: *avr* ("avirulence"), *hrp* ("hypersensitive response and pathogenicity"), *dsp* ("disease specific") e *hsv* ("host specific virulence").

Genes *avr* (de avirulência) são genes que restringem o número de hospedeiros do patógeno de acordo com a presença de genes presentes nos hospedeiros (Ronald & Staskawicz, 1988). Excluiu-se a possibilidade de envolvimento de genes *avr*, pois a interação observada no presente trabalho foi de ampliação da gama de hospedeiros de um patógeno e não restrição.

Quanto aos genes *dsp*, específicos de doença, são genes exclusivamente relacionados com a resposta de patogenicidade no hospedeiro e não têm relação com a indução de hipersensibilidade em não hospedeiros ou reconhecimento de hospedeiro. Apenas um gene *dsp* foi descrito em *Xanthomonas* (Seal *et al.*, 1990). Se tais genes estivessem envolvidos com a resposta de patogenicidade apresentadas pela linhagem 289NaI<sup>f</sup>/73 em tomate (não hospedeiro da linhagem 289NaI<sup>f</sup>) poderíamos supor a ocorrência de superexpressão destes genes. Nesse caso, seria esperado que a introdução desses genes em linhagens selvagens de

*Xanthomonas*, acentuaria a virulência para seus hospedeiros naturais. No entanto isto não foi observado quando linhagens de *X. campestris* pv. *manihotis* 289NaI<sup>f</sup> e *X. campestris* pv. *phaseoli* 558 foram eletrotransformadas com o plasmídeo pVM73 e testadas em seus respectivos hospedeiros. A partir destes testes descartou-se a hipótese de que genes específicos de doença estivessem envolvidos e que uma superexpressão de genes de patogenicidade pudesse ser a causa dos sintomas de patogenicidade observados em tomate quando inoculados com a linhagem 289NaI<sup>f</sup>/73.

Um outro grupo de genes, *hrp*, é responsável pela indução da resposta de hipersensibilidade em plantas não hospedeiras e de patogenicidade em hospedeiras sensíveis (Willis *et al.*, 1991). São os genes de patogenicidade mais descritos em *Xanthomonas*. O clone 289NaI<sup>f</sup>/73 foi testado em tabaco com o objetivo de verificar um possível envolvimento de gene *hrp*. Se tais genes estivessem presentes no plasmídeo pVM73, a linhagem 289NaI<sup>f</sup>/73 apresentaria uma resposta diferente, ao menos a nível de intensidade, da linhagem controle 289NaI<sup>f</sup>/pUFR027. Como não foi observada nenhuma diferença de resposta entre estas linhagens neste hospedeiro, descartou-se a hipótese de se estar trabalhando com genes *hrp*.

A partir dos resultados obtidos com os testes de patogenicidade conclui-se que foi clonado um fragmento de DNA envolvido com o reconhecimento de hospedeiros, do tipo *hsv*.

A hibridização de DNA total de diferentes patovares usando-se o inserto *EcoRI* como sonda, revelou homologia com vários patovares. A homologia foi maior com DNA de linhagens do mesmo patovar (*vesicatoria*) e com alguns patovares distintos (*patovar glycines*, *citri* e *campestris*). Esta homologia pode indicar sequências com mesma função (reconhecimento de hospedeiros) nestas linhagens. Resultados mostrando genes com grande homologia, próxima de 100%, que apresentavam papéis biológicos semelhantes, mas com especificidades distintas foram apresentado por Canteros *et al.* (1991) e Bonas *et al.* (1989).

As diferenças encontradas por estes autores entre dois genes de avirulência de *X. campestris* pv. vesicatoria eram de apenas alguns nucleotídios em sequências repetidas destes genes.

O plasmídeo pVM73 apresentou comportamento semelhante nas linhagens *X. campestris* pv. *glycines* 333Sp e *X. campestris* pv. *citri* 223 que passaram a induzir sintomas atípicos em tomate após a introdução deste plasmídeo. Essas duas linhagens apresentaram um perfil de hibridização semelhante ao do patovar vesicatoria (Figura 11). Nestas linhagens, as bandas de hibridização observadas devem representar sequências relacionadas com o reconhecimento de hospedeiros. Porém, as linhagens *X. campestris* pv. *phaseoli* 558 e *X. campestris* pv. *manihotis* 289 apresentaram baixa homologia com o inserto *EcoRI* de 2.2 kb. Destas duas, *X. campestris* pv. *manihotis*, compatível com mandioca, foi a única que mostrou alteração no reconhecimento do novo hospedeiro, tomate, quando transformada com o plasmídeo pVM73. A segunda linhagem que apresentou baixa homologia, *X. campestris* pv. *phaseoli* 558, não apresentou alterações de sintomas em tomate. Os dois resultados discrepantes podem ser tentativamente atribuídos à diferença na estrutura e/ou organização dos genes desde que *X. campestris* pv. *phaseoli* 558 apresentou duas bandas de homologia indicando que ela difere de *X. campestris* pv. *manihotis* 289. Já a linhagem de *Pseudomonas*, pertencente a um outro gênero de bactéria, que reconhece como hospedeiro gérbera, não apresentou nenhuma homologia e deve apresentar um mecanismo completamente distinto de reconhecimento de hospedeiro. Seria interessante pesquisar se linhagens de *P. solanacearum* e *P. syringae* que têm como hospedeiro o tomate, possuem mecanismo semelhante ao de *Xanthomonas*. Seria também elucidativo clonar os fragmentos de DNAs homólogos ao inserto *EcoRI* de 2.2 kb de outros patovares, testar seus papéis biológicos e verificar as diferenças na sequência de DNA. Essas diferenças, se detectadas, poderiam informar como é determinada a especificidade de hospedeiro.

A análise de sequência de DNA mostrou que há dois quadros de leitura prováveis que poderiam corresponder ao gene *hsv*. O quadro de leitura denominado ORF1 apresenta homologia com genes envolvidos na secreção de fatores relacionados com patogenicidade

em *X. campestris* (Dums *et al.*, 1991). Os genes de secreção geralmente fazem parte de complexos membranares envolvidos na secreção de produtos protéicos. O quadro de leitura denominado ORF2 apresenta homologia com regulador de transcrição de fatores de virulência de *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica* (Arico *et al.*, 1991). Da comparação de sequência de DNA do fragmento *EcoRI* de 2.2 kb com banco de dados pode-se supor que o gene *hsv* apresente alguma função relacionada com o sistema de secreção. Possivelmente o produto deste gene necessita ser exportado, ou age a nível de membrana como uma proteína “sensora” ou ainda como uma proteína de função estrutural facilitando a secreção. Outra possibilidade é que o gene *hsv* apresente alguma função relacionada com regulação da expressão de genes envolvidos na patogenicidade.

Admitindo-se que sistemas de secreção estejam envolvidos, decidiu-se conduzir experimentos para testar a produção de enzimas extracelulares e produção de goma pela linhagem 289Nal<sup>f</sup>/73 que contém este plasmídeo (dados não mostrados). Não foram encontradas diferenças na produção de pectinase, celulase e protease entre a linhagem 289Nal<sup>f</sup> e 289Nal<sup>f</sup>/73 (com o plasmídeo pVM73). Estas duas linhagens também não produzem amilase. Quanto à produção de goma xantana, ambas as linhagens, 289Nal<sup>f</sup> e 289Nal<sup>f</sup>/73 apresentaram o mesmo nível de produção. Tais resultados mostraram que os genes clonados não estão envolvidos com a secreção de enzimas extra-celulares nem com a produção de goma xantana.

Willis *et al.* (1991) observaram que determinados genes de patogenicidade podem estar reprimidos em meio de cultura. A semelhança no perfil de proteínas das linhagens 289Nal<sup>f</sup> e 289Nal<sup>f</sup>/73 de *X. c. pv. manihotis* pode significar que o gene *hsv* pode estar reprimido devido ao meio de cultura utilizado, ou que a quantidade de proteína é muito pequena e não observável num gel de proteínas. Uma outra possibilidade é que a proteína diferencial produzida pela linhagem recombinante 289Nal<sup>f</sup>/73 apresente tamanho próximo ao de outras proteínas que ambas as linhagens produzem e que apareça no gel como uma banda única. Experimentos poderiam ser conduzidos onde as condições de cultivo da bactéria

fossem diferentes na tentativa de analisar a repressão do gene (Xiao *et al.*, 1992 e Schulte & Bonas, 1992). Técnicas mais sensíveis para detectar o produto do gene, como por exemplo, Western blot (imunobloting) de proteínas (Voloudakis *et al.*, 1993) ou eletroforese bidimensional (De Mot & Vanderleyden, 1989) também poderiam ser utilizadas.

## **Parte 2**

### **Isolamento e caracterização de mutantes não patogênicos de *X. campestris* pv. vesicatoria utilizando-se o transposon Tn5**

## REVISÃO DE LITERATURA

Os mecanismos básicos envolvidos na fitopatogenicidade de microrganismos estão começando a ser desvendados. Inúmeros genes vêm sendo descritos e suposições estão sendo feitas a respeito de suas funções (ver revisão de genes de patogenicidade, item 1.2.1). Um ponto em comum na maioria dos estudos da interação planta-microrganismo patógeno, do ponto de vista do patógeno, é a obtenção de mutantes não patogênicos. São reconhecidos como mutantes não patogênicos aqueles que apresentam crescimento normal fora do tecido da planta (prototróficos), mas que de alguma maneira têm sua interação com a planta hospedeira prejudicada (Daniels *et al.*, 1987). Por apresentar diferenças em relação à linhagem selvagem que os tornam não patogênicos, supõem-se que tais fatores alterados estejam envolvidas na complexa resposta de patogenicidade. São exemplos de fatores envolvidos na patogenicidade as toxinas de *P. phaseolicola* (Patil *et al.*, 1974) e enzimas pectolíticas de *E. chrysanthemi* (Chatterjee & Starr, 1977). Mutantes defectivos para estes fatores apresentam alteração na sua virulência, deixando evidente seus papéis na patogenicidade (Daniels *et al.*, 1984a).

No estudo genético da interação de bactérias fitopatogênicas com seus hospedeiros algumas etapas são fundamentais: a obtenção de mutantes não patogênicos, a seleção destes mutantes e suas caracterizações seguidas de complementação das características defectivas.

O processo de obtenção de mutantes têm sido realizado principalmente através de inserções aleatórias de elementos transponíveis. No entanto este não é o único processo, também são utilizados, em menor escala, mutações químicas (agentes intercalantes) e físicas (radiações). Dentre os elementos transponíveis o mais comumente utilizado é o transposon Tn5 (Bruijn & Lupski, 1984). A introdução deste elemento de transposição na célula bacteriana geralmente é realizada através de conjugação onde o transposon, presente num

plasmídeo conjugativo passa para a célula receptora e se transpõe aleatoriamente para o DNA do novo hospedeiro causando-lhe inativação insercional de determinados genes.

Obtidos os mutantes, a próxima etapa é o processo de seleção dos não patogênicos. Este processo tem que ser capaz de diferenciar mutantes que apresentem deficiência em algum fator envolvido na patogenicidade e ao mesmo tempo ser viável para testar um grande número de mutantes (Daniels *et al.*, 1984a).

Vários testes de patogenicidade já foram descritos e alguns preenchem os requisitos de uma seleção de mutantes não patogênicos dentre um grande número de recombinantes. Daniels *et al.* (1984a) descreveram o teste em plântulas (ver descrição dos testes de patogenicidade no item I-1.4) que é rápido, apresenta resultados satisfatórios e permite que um grande número de mutantes sejam testados. Outro teste adequado para um processo de seleção dentre um grande número de recombinantes é o teste de hipocótilos descritos por Marques & Rosato (1995). Nestes dois testes a avaliação pode ser realizada após um curto espaço de tempo (em torno de três dias). Outros testes de patogenicidade já foram descritos, tais como testes em sementes e infiltração em folhas, no entanto são testes mais laboriosos e que demandam tempo e custo maior, tornando-se impraticáveis quando se tem um número grande de mutantes a serem testados. Estes testes, embora mais trabalhosos, apresentam resultados bastante confiáveis e grande sensibilidade, permitindo diferenciar mesmo resultados mais sutis, o que os tornam adequados para uma melhor caracterização dos mutantes não patogênicos previamente selecionados.

Além dos testes de patogenicidade, outros são realizados para caracterizar mutantes não patogênicos. Estes outros testes incluem testes de prototrofia, produção de enzimas extracelulares e curvas de crescimento (Daniels *et al.*, 1987 e Daniels *et al.*, 1984a).

Através da caracterização destes mutantes pode-se classificá-los de acordo com as classes de mutantes não patogênicos descritas: mutantes não produtores de enzimas extracelulares (Tang *et al.*, 1987), não produtores de toxinas (Patil *et al.*, 1974) e mutantes para determinada classe de genes de patogenicidade (descritos no item 1.2.1).

O presente trabalho teve como objetivo a obtenção de mutantes não patogênicos através da mutação de uma linhagem de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, patogênica para tomate e pimentão, utilizando-se o transposon Tn5, caracterização destes mutantes através de testes de patogenicidade e tentativa de complementação através de cruzamento dos mutantes com banco de DNA da linhagem selvagem.

## I - 1 - MATERIAL E MÉTODOS

### II - 1.1 - Linhagens bacterianas e plasmídios

As linhagens de *X. campestris*, *E. coli* e plasmídios utilizados estão relacionadas na tabela I.

Tabela I - Linhagens bacterianas e plasmídios

Linhagem/plasmídio	Características	Fonte ou referência
<i>X. campestris</i>		
<b>pv. vesicatoria</b>	<b>Patógeno de tomate e pimentão</b>	
479	Tipo selvagem	SBF-IB, Campinas, S.P.
479Nal <sup>r</sup>	479, resistente ao ácido nalidíxico	Laboratório de Genética de bactérias-CBMEG-Unicamp
Mut2	479Nal <sup>r</sup> ::Tn5; não compatível com tomate e pimentão. Auxotrófico, de coloração branca em meio NYGA	Este trabalho
Mut7 e 9	479Nal <sup>r</sup> ::Tn5, não compatíveis em tomate e compatíveis em pimentão	Este trabalho
Mut5, 6, 8,	479Nal <sup>r</sup> ::Tn5, não compatíveis com tomate e pimentão	Este trabalho
Mut3, 4, 10 e 11	479Nal <sup>r</sup> ::Tn5, não compatíveis com tomate e pimentão e não produtores de pectinase	Este trabalho
479Nalsp	Mutante espontâneo da linhagem 479Nal <sup>r</sup> não compatível com tomate e pimentão	Este trabalho

SBF-IB - Seção de Bacteriologia Fitopatológica, Instituto Biológico

Tabela I - Linhagens bacterianas e plasmídios (continuação)

Linhagem/plasmídio	Características	Fonte ou referência
<b>pv. campestris</b>	<b>Patógeno de crucíferas</b>	
Ca110.42	Mutante por inserção do transposon Tn5 não produtor de pectinase, celulase, protease e amilase	Destefano & Rosato, 1991
<b>pv. manihotis</b>	<b>Patógeno de mandioca</b>	
289	Tipo selvagem	SBF-IB, Campinas, S.P.
<b>Escherichia coli</b>		
WR6016	<i>Lac, recA, F'lac::Tn5, Km<sup>r</sup></i> (gene de resistência a canamicina)	Sansonetti <i>et.al.</i> , 1982
pRK2073	<i>tra<sup>+</sup>, mob<sup>+</sup></i> , resistente a espectinomicina	Leong <i>et.al.</i> , 1982
pUFR043	Cosmídio de 10.3Kb, IncW, Gm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , <i>mob<sup>+</sup>, lacZa<sup>+</sup>, mob<sup>+</sup></i>	De Feyter & Gabriel, 1991

## II-1.2 - Cultivares de plantas

Os cultivares de planta utilizados estão relacionados na tabela II.

Tabela II - Cultivares de plantas utilizadas nos testes de patogenicidade

Planta	Cultivar	Procedência
Tomate ( <i>Lycopersicum esculentum</i> )	Angela Gigante I - 5100	Asgrow
Pimentão ( <i>Capsicum annum</i> )	Casca dura Ikeda	Agroflora
Tabaco ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	Petit Havana SR1	Maligna <i>et. al.</i> , 1973

## II-1.3 - Meios de cultura e antibióticos

Os meios de cultura e germinação de sementes foram os mesmos descritos no item I-1.3.

## II-1.4 - Mutagênese de *Xanthomonas* com transposon Tn5

A mutagênese com o transposon Tn5 foi realizada através da conjugação da linhagem de *X. campestris* pv. *vesicatoria* 479Nal<sup>f</sup> (receptora) com linhagem *E. coli* WR6016 (doadora) contendo o transposon Tn5 inserido num plasmídio F<sup>'</sup>lac conjugativo (Sansonetti *et al.*, 1982) que não se replica em *Xanthomonas*.

Para a conjugação, as linhagens receptora e doadora foram crescidas em meios líquidos apropriados com os respectivos antibióticos durante 15 horas sob agitação e temperaturas adequadas. Foi centrifugada por três minutos a 12000 rpm 1,5 ml de cultura da

linhagem doadora. O sobrenadante foi descartado e as células suspensas em solução de NaCl 0.9 % e novamente centrifugadas nas mesmas condições. Descartou-se o sobrenadante e por fim as células foram suspensas em 50 µl de solução de NaCl 0.9 %. O mesmo procedimento foi realizado com a cultura de células receptoras. Estas lavagens das células com solução de NaCl 0.9 % foram efetuadas para retirar os antibióticos que estavam no meio de cultura de cada célula. Em seguida as células doadoras e receptoras foram colocadas num mesmo tubo e os 100 µl finais foram gotejados numa placa de meio NYGA sem antibiótico. Após 24 horas a 28°C foi retirada uma amostra da gota de conjugação, diluída em solução de NaCl 0.9 % e plaqueada em meio NYGA com o antibiótico para o qual a linhagem receptora era resistente e canamicina, sendo que a resistência a este último é conferida pelo transposon Tn5.

#### **II-1. 5 - Seleção e caracterização de mutantes não patogênicos**

A seleção de recombinantes não patogênicos foi efetuada através de testes de patogenicidade em plântulas de tomate utilizando-se como controle positivo a linhagem selvagem e como controle negativo uma linhagem de *X. campestris* pv. *manihotis*, não compatível com tomate. O teste é descrito no item I-1.4.3. A resposta foi avaliada nos 5 dias posteriores. Os mutantes que não apresentaram sintomas de patogenicidade foram selecionados para testes posteriores.

Além de testes em plântulas de tomate usados para a seleção inicial dos mutantes, foram também empregados outros testes para uma melhor caracterização dos mutantes selecionados. Empregou-se testes em sementes e infiltração em folhas de plantas adultas de tomate e pimentão (testes descritos no item I-2.1.2). No teste de infiltração em folha de tomate foi realizada a contagem do número de células. Para realizar esta contagem, bactérias crescidas em meio líquido foram centrifugadas e suspensas em solução de NaCl 0.9 %. A absorbância da solução, medida a 600nm, foi ajustada para 0.5 através da adição de solução de NaCl 0.9%. Todo o tecido foliar foi infiltrado com esta suspensão bacteriana. A partir da

hora do inóculo foram retiradas amostras do tecido foliar num intervalo de 24 horas. As plantas foram mantidas sob condições de fotoperíodo (8 horas de luz) e temperatura (30°C) controlados. As amostras eram compostas de três discos foliares de 3 mm de diâmetro cada. Estes discos foram retirados aleatoriamente, macerados em 1ml de solução de NaCl 0.9 %, diluídos e plaqueados para a contagem do número de bactérias.

Também foi realizado o teste de hipersensibilidade em folhas de tabaco (testes descritos no item I-2.1.2).

### **II-1.5.1 - Produção de enzimas extracelulares**

Meios especiais foram utilizados para detectar a produção de enzimas extracelulares (protease, celulase, amilase e pectinase). Esses meios especiais são descritos abaixo. Como controles foram utilizadas as linhagens 479Nal<sup>f</sup> e Ca110.42, positiva e negativa, respectivamente, para a produção destas enzimas:

#### **Meio para detecção de atividade proteolítica**

O meio para adetectar atividade proteolítica foi preparado de acordo com Tang *et al.* (1987).

Meio NYGA contendo 0.2% de leite em pó desnatado comercial (Molico). As linhagens a serem testadas foram repicadas “por ponto” neste meio e deixadas a 28°C por 48 horas. A resposta positiva foi caracterizada por halos claros ao redor da colônia e negativa pela ausência de halos.

#### **Meio para detecção de atividade amilolítica**

Meio NYGA contendo 0.2% de amido solúvel. O pH foi ajustado para 6.0. A revelação foi feita com vapor de iodo. Foram consideradas positivas as colônias que apresentavam halos claros ao redor da colônia e negativas as colônias que não apresentaram halos.

### **Meio para detecção de atividade celulolítica**

O meio para testar atividade celulolítica foi adaptado de Boccara *et al.*

(1988).

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	12.8 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0 g
NaCl	0.5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1.0 g
Glicose 20%	20.0 ml
Glicerol	5.0 ml
Carboximetilcelulose	5.0 g
Extrato de levedura	1.0 g
Ágar	15.0 g
Água q.s.p. 1000 ml	

O pH do meio foi ajustado para 7.0.

As linhagens testadas foram repicadas “por ponto”, deixadas por 48 horas a 28°C e a revelação foi realizada com solução Vermelho-Congo 0.1 %. Foram consideradas como positivas as linhagens que apresentaram halos em torno da colônia. As negativas não apresentaram halos.

### **Meio para detecção de atividade pectinolítica**

Este meio foi adaptado de Boccara *et al.* (1988)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	12.8 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0 g
NaCl	0.5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1.0 g
Glicose 20%	20.0 ml
Glicerol	5.0 ml
Pectina cítrica	5.0 g
Extrato de levedura	1.0 g
Ágar	15.0 g
Água q.s.p. 1000 ml	

O pH do meio foi ajustado para 7.0.

A revelação foi feita após 48 horas de crescimento das colônias neste meio a 28°C, com brometo de amônio hexadeciltrimetil 1 %. Caracterizou-se como resposta positiva halos em torno da colônia e como negativa a ausência de halos.

### **II-1.5.2 - Crescimento em meio mínimo (teste de prototrofia)**

Para se testar possível auxotrofia as linhagens bacterianas foram crescidas em meio mínimo MPI (Sow & Demain, 1979) e deixados durante 72 horas a 28°C. O meio MPI é descrito abaixo

Meio MPI	
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>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.0 g
Ácido cítrico	2.0 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.006 g
ZnO <sub>2</sub>	0.006 g
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.0024 g
CaCO <sub>3</sub>	0.02 g
Hcl	0.13 ml
Água q.s.p.	1000 ml.

O pH do meio foi ajustado para 7.0 com NaOH.

### **II-1.5.3 -Curva de crescimento**

O crescimento das linhagens em meio completo foi avaliado através da leitura de absorvância a 600 nm. As bactérias cresceram 12 horas em 5 ml de meio NYGB (pré-inóculo) sob agitação de 250 rpm a 28°C. Aliquotas do pré-inóculo foram então transferidas para Erlenmeyers com 50 ml de meio NYGB de forma que a absorvância da solução fosse igual a 0.05. A partir destes inóculos foram retiradas amostras para avaliar o crescimento destas linhagens neste meio. Os frascos com o meio de cultura foram mantidos a 28°C sob

mesma agitação durante todo o experimento. A cada 3 horas retiraram-se duas alíquotas de 1ml a partir do inóculo inicial para medir a absorbância da solução, perfazendo um total de 33 horas. A média dessas medidas foi usada para traçar a curva de crescimento das linhagens até que atingissem a fase estacionária.

#### **II-1.6 - Perfil plasmidial da linhagem selvagem e dos mutantes**

As linhagens mutantes e selvagem foram submetidas a extração de plasmídios segundo o método de lise alcalina modificado de Birboin & Doly (1979) descrito por Maniatis *et al.* (1982). Os plasmídios obtidos foram digeridos com diferentes enzimas de restrição para comparar o perfil plasmidial dessas linhagens. As enzimas utilizadas foram *AccI*, *BamHI*, *EcoRI*, *HincII*, *HindIII*, *KpnI*, *PstI*, *SacI*, *SmaI*, *XbaI* e *XhoI*.

#### **II-1.7 - Construção de banco de DNA plasmidial**

Os plasmídios da linhagem *X. campestris* pv. *vesicatoria* 479Nal<sup>r</sup> foram digeridos com *EcoRI* de acordo com as instruções do fabricante (BioLabs, Gibco BRL e Pharmacia). A análise dos produtos das digestões foram feitas por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

O vetor (Figura 15 ) digerido com *EcoRI* foi defosforilado com CIP (New England) por uma hora a 37°C. A CIP foi inativada com a adição de 5 mM de EDTA e aquecimento a 75°C por 10 minutos. Após a inativação o DNA foi purificado com mesmo volume de fenol:clorofórmio (1 volume: 1 volume). Ao vetor foram ligados os fragmentos obtidos da digestão do DNA plasmidial da linhagem selvagem digeridos com *EcoRI*. A reação de ligação foi efetuada durante a noite (aproximadamente 16 horas) a 14°C. Foram utilizados 30 ng de vetor, 100 ng de inserto e 0.5 unidade de ligase, num volume final de 10 µl. O produto da ligação foi utilizado para eletrotransformar células de *E. coli* DH5α. As condições de eletroporação utilizadas foram iguais às descritas pelo fabricante (Bio-Rad). As células transformadas foram selecionadas em placas com meio LB contendo os

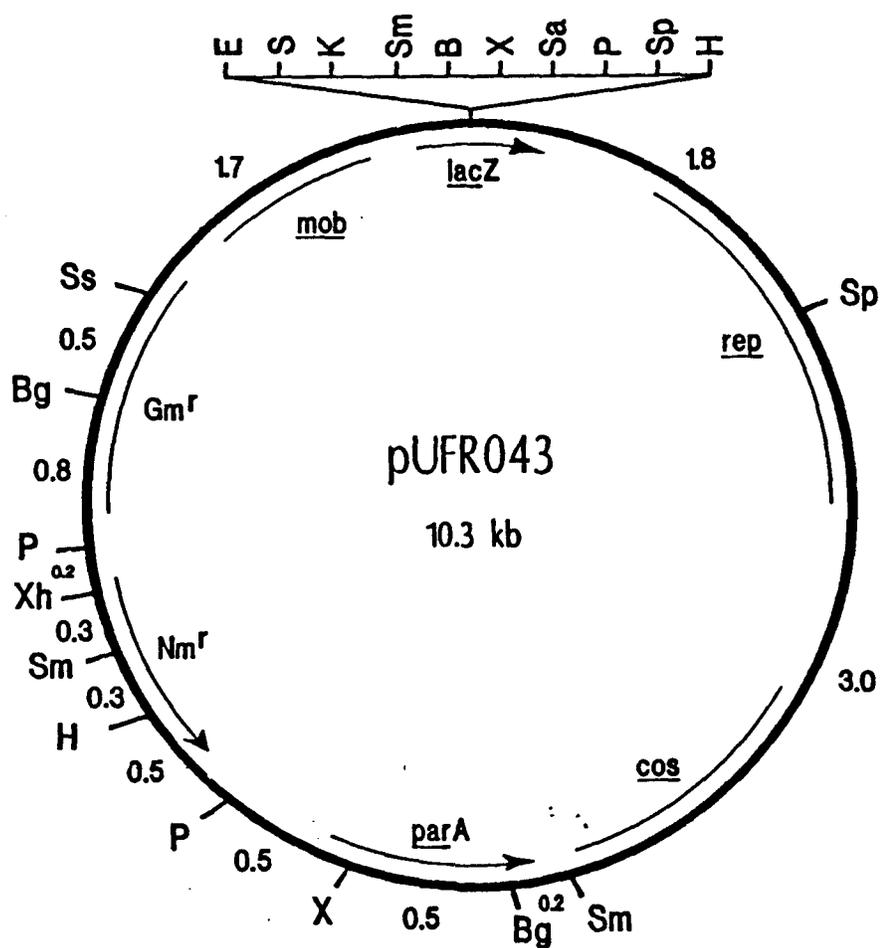


Figura 15 - Representação esquemática do cosmídio pUFR043, funcional em *Xanthomonas* e *E. coli*. Os sítios de restrição deste vetor são indicados pelas seguintes abreviações: B, *Bam*HI; Bg, *Bg*III; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; K, *Kpn*I; P, *Pst*I; S, *Sst*I, Ss, *Sst*II; Sa, *Sal*I; Sm, *Sma*I; Sp, *Sph*I; X, *Xba*I e Xh, *Xho*I (De Feyter & Gabriel, 1991).

antibióticos gentamicina e canamicina (a resistência a estes antibióticos é conferida pelo vetor) e Xgal.

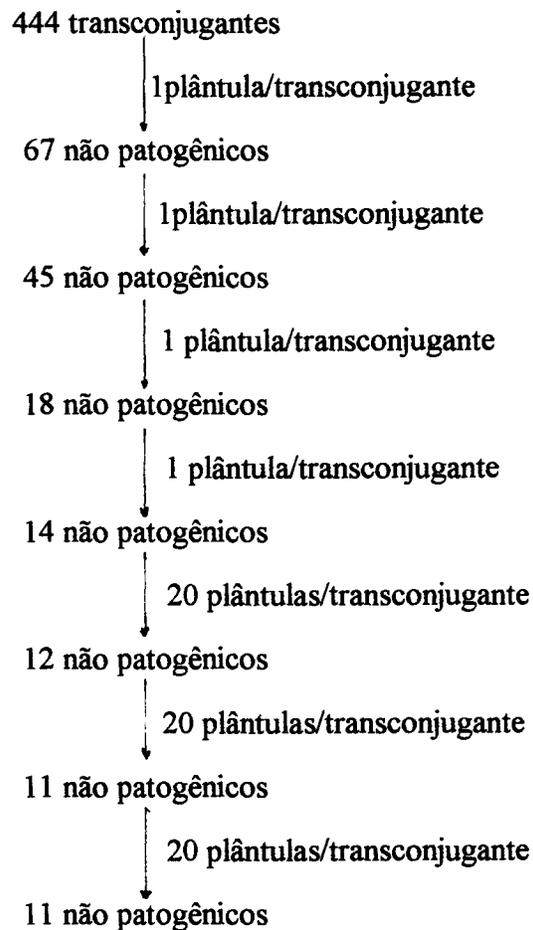
### **II-1.8 - Complementação de mutantes não patogênicos com banco de plasmídio**

Os plasmídios do banco foram mobilizados para linhagens mutantes através de conjugação triparental (Leong *et al.*, 1982). Para a conjugação as linhagens foram crescidas em meios líquidos apropriados com os respectivos antibióticos durante 15 horas sob agitação de 250 rpm. As culturas da linhagem doadora (banco de plasmídios), receptora (mutantes não patogênicos) e linhagem “helper” pRK2073 foram centrifugadas a 12000 rpm por 3 minutos nas seguintes proporções: 1.5ml da receptora, 0.5ml da doadora e 0.5ml do “helper” em tubos separados. O sedimento celular foi lavado com 200 µl de solução de NaCl 0.9 %, novamente centrifugado e suspenso em 50 µl. Reuniu-se o volume dos três tubos e os 150 µl resultantes foram gotejados em placa de Petri com meio NYGA sem antibiótico. Após 24 horas a 28<sup>o</sup>C, foi retirada uma amostra da massa celular de conjugação, diluída em solução de NaCl 0.9 % e plaqueada em meio NYGA com os antibióticos apropriados. Através de extração de plasmídios em pequena escala e digestão com enzimas de restrição (*EcoRI*) selecionou-se os clones que foram submetidos a testes de patogenicidade em tomate e pimentão (testes em sementes e folhas) para verificar uma possível complementação. Estes testes foram realizados duas vezes.

## II -2 - RESULTADOS

### II-2.1 - Isolamento de mutantes não patogênicos

Do cruzamento da linhagem *X. campestris* pv. *vesicatoria* 479Nal<sup>r</sup> com *E. coli* WR6016 contendo o transposon Tn5, foram obtidos 11 mutantes não patogênicos de um total de 444 transconjugantes (2.5%). O teste realizado para a primeira seleção dos mutantes não patogênicos feito em plântulas de tomate seguiu o esquema abaixo:



Estes onze mutantes que não apresentaram respostas de patogenicidade em plântulas de tomate foram selecionados e submetidos a outros testes para uma melhor caracterização.

## **II -2.2- Caracterização dos mutantes não patogênicos**

### **II -2.2.1 - Indução de hipersensibilidade em folhas de tabaco**

Todos os mutantes e a linhagem 479Nal<sup>f</sup> mostraram-se capazes de induzir resposta de hipersensibilidade em folhas de tabaco. Tal resposta apareceu cerca de 48 horas após o inóculo das bactérias no tecido foliar, no mesmo período que a linhagem selvagem 479Nal<sup>f</sup>.

### **II-2.2.2 - Produção de enzimas extracelulares**

Dentre os 11 mutantes, quatro deles (Mut3, Mut4, Mut10 e Mut11) não produziram pectinase. A produção das demais enzimas (protease, celulase e amilase) foi detectada por todos os mutantes e pela linhagem 479Nal<sup>f</sup>.

### **II -2.2.3 - Crescimento em meio mínimo**

Todos os mutantes, com exceção do Mut2, apresentaram crescimento normal, semelhante ao da linhagem selvagem neste meio mínimo. Este mutante apresentou deficiência na produção de algum elemento não identificado presente em extrato de levedura. O mutante Mut2 além de mostrar-se auxotrófico apresenta uma coloração branca, contrastando com a coloração amarela da linhagem selvagem e dos demais mutantes.

### **II -2.2.4 - Crescimento em meio completo**

Todos os mutantes apresentaram crescimento semelhante ao da 479Nal<sup>f</sup> em meio completo NYGB. Foram elaboradas curvas de crescimento de todos os mutantes, obtidas a partir dos resultados de leitura de absorbância, porém, são mostradas nas figuras 16 e 17 apenas curvas de alguns mutantes como ilustração. Todas as linhagens testadas, mutantes ou selvagem atingiram, após aproximadamente 3 horas de inoculação, a fase de crescimento exponencial que se prolongou até aproximadamente 25 horas. Neste meio, mesmo o mutante Mut2 apresentou crescimento normal, igual ao da linhagem 479Nal<sup>f</sup>.

## **II -2.2.5 - Patogenicidade em pimentão**

### **II -2.2.5.1 - Teste em sementes**

As plântulas originadas das sementes tratadas com suspensão bacteriana das linhagens Mut7 e Mut9 apresentaram, após 14 dias manchas escuras na superfície abaxial das folhas. Observou-se neste teste que as plântulas tratadas com estes mutantes apresentaram uma germinação e crescimento anômalos, isto é, um número grande de sementes não germinou e o crescimento das que germinaram foi lento em relação à plântulas dos outros grupos. Estas manchas, porém, não evoluíram para uma resposta semelhante à apresentada pelas plantas do grupo controle positivo (479Nal<sup>f</sup>). Nestas últimas, após 14 dias, as plântulas ficaram úmidas e necrosadas. Nos demais mutantes não foi observada nenhuma resposta, resultado semelhante ao da linhagem *X. campestris* pv. *manihotis* 289, controle negativo.

### **II - 2.2.5.2 - Teste em plântulas**

Este teste não apresentou resultados satisfatórios. Mesmo o controle positivo mostrou um grande número de plântulas sem sintoma de patogenicidade (43%). Apenas os mutantes Mut7 e Mut9 apresentaram resposta semelhante à linhagem selvagem. Para estes mutantes, o número de plântulas com sintomas foi de 39% e 41%, respectivamente. Todos os demais mutantes não apresentaram nenhuma plântula com sintomas de patogenicidade.

Todos os tratamentos apresentaram plântulas com clorose intensa, porém com frequências diferentes.

### **II -2.2.5.3 - Teste em folhas**

Os resultados deste teste foram bastante elucidativos após 4 dias. Os mutantes Mut7 e Mut9 confirmaram os resultados de patogenicidade obtidos nos testes em sementes e plântulas. Vinte e quatro horas após a inoculação das folhas, a região do inóculo tornou-se úmida e clara. Com 48 horas estas regiões foram se tornando escuras. Após três dias a lesão

Absorbância

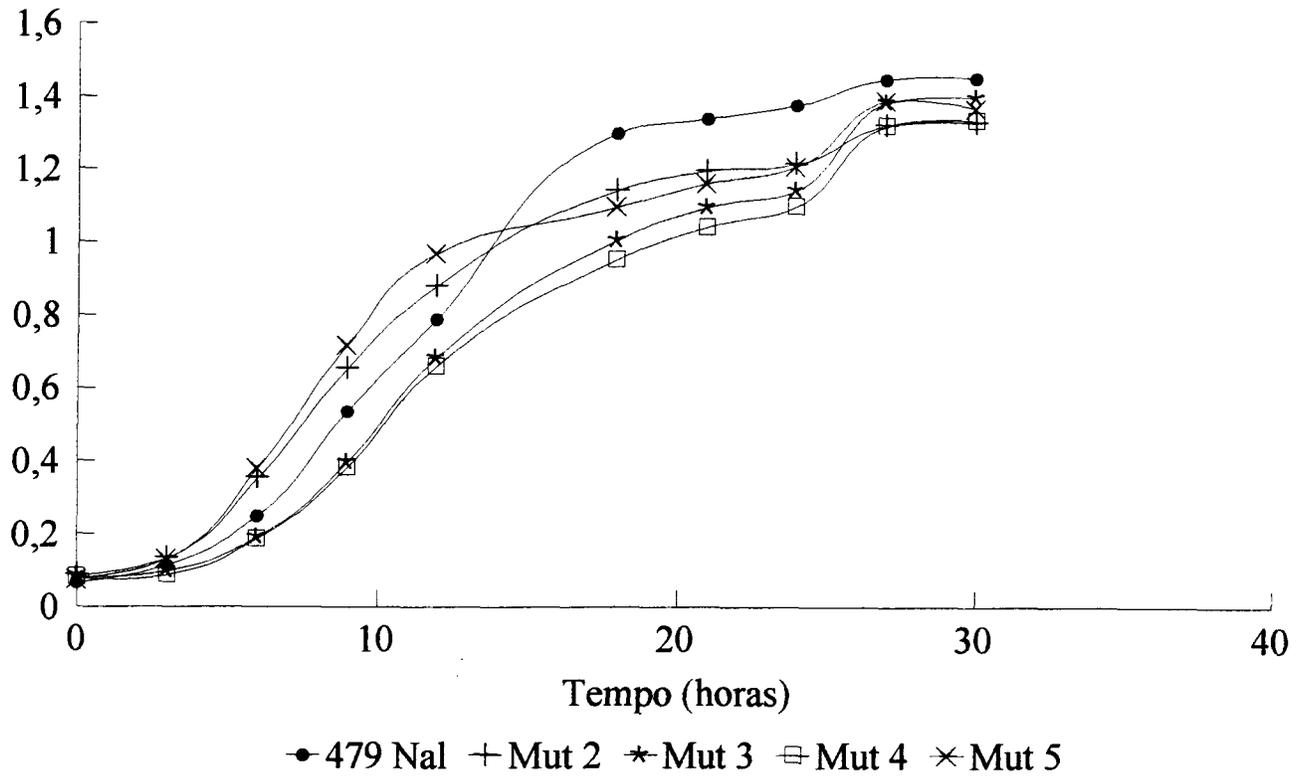
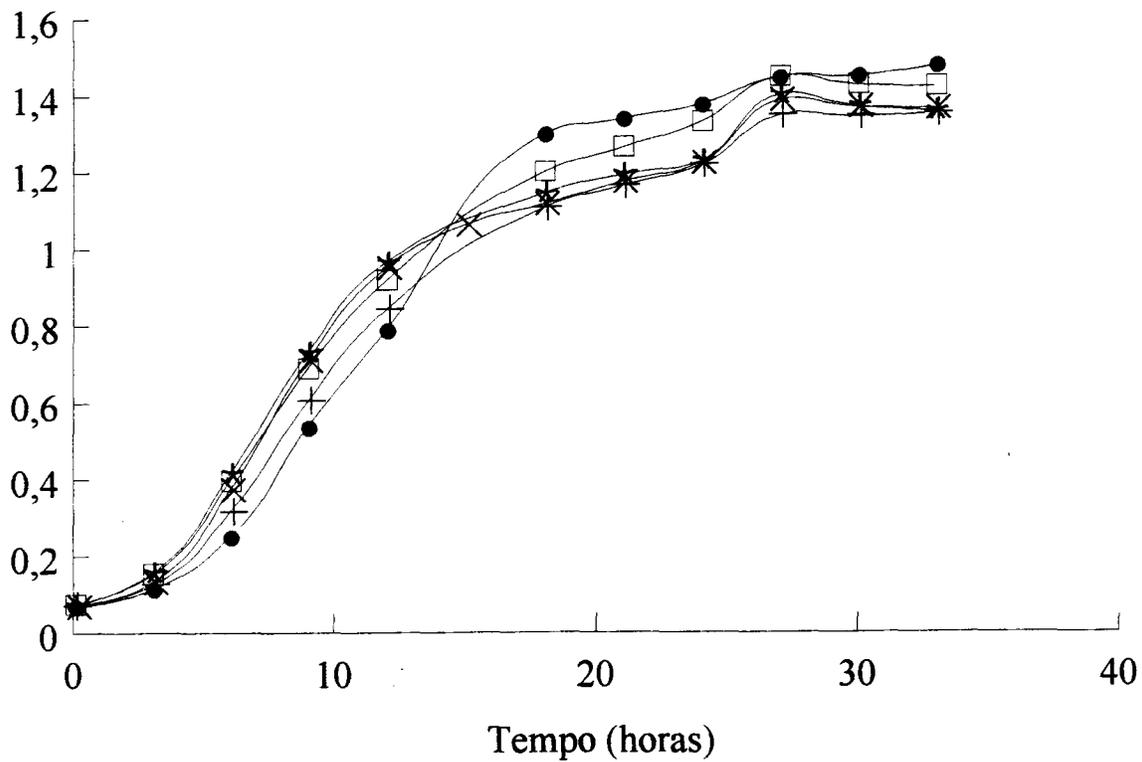


Figura 16 - Curva de crescimento através da medida da absorbância ( a 600nm) da linhagem patogênica (479Nal<sup>f</sup>) e dos mutantes Mut2, Mut3, Mut4 e Mut5 em meio NYGB.

Absorbância



● 479Nal + Mut 6 \* Mut 8 □ Mut 9 × Mut 11

Figura 17 - Curva de crescimento através da medida da absorbância ( a 600 nm) da linhagem patogênica (479Nal<sup>r</sup>) e dos mutantes Mut6, Mut8, Mut9 e Mut11 em meio NYGB.

do tecido começou a se espalhar e com quatro dias a resposta de patogenicidade era bastante clara. Em uma folha inoculada com Mut7 a lesão atingiu até mesmo o pecíolo da folha.

Um resultado ímpar deste teste é que o mutante Mut3, que não havia apresentado nenhum sintoma nos demais testes com este hospedeiro, apresentou-se patogênico em folhas de pimentão.

Os demais mutantes mostraram-se não patogênicos, como o controle negativo. Do teste de exudação, efetuado ao microscópio óptico comum, só foram observadas bactérias nas folhas inoculadas com os Mut3, 7, 9 e 479Na<sup>f</sup>. Nestas folhas foram encontradas colonização até mesmo dos tecidos adjacentes à região do inóculo. Para comprovar que a lesão era realmente causada pela *Xanthomonas* foram reisoladas colônias de *Xanthomonas* a partir dessas lesões.

#### **II -2.2.6 - Patogenicidade em tomate**

Todos os mutantes foram utilizados nos testes em tomate, porém, foram selecionados apenas três mutantes que apresentaram características distintas nos testes anteriores de caracterização para a elaboração de curvas de crescimento em tecido deste hospedeiro. Assim, escolheu-se os mutantes Mut2, auxotrófico, o Mut11, prototrófico e não produtor de pectinase o Mut8, prototrófico e produtor de todas as enzimas extracelulares.

##### **II -2.2.6.1 - Teste em sementes**

Todos os mutantes não apresentaram sintomas de patogenicidade em sementes de tomate. Das plântulas do grupo controle positivo, testadas com a linhagem selvagem 479Na<sup>f</sup>, 90% apresentaram sintomas de patogenicidade a partir do 9º dia após o tratamento das sementes. Em algumas plântulas dos grupos testados com Mut2, Mut8, Mut11 e *X. campestris* pv. *manihotis* 289 (controle negativo) as folhas se apresentaram amareladas por volta do 11º dia após o tratamento. No entanto não houve evolução desta resposta para uma

de patogenicidade (enegrecimento e apodrecimento da plântula). Quanto ao número de células por plântula (Figura 18) é clara a diferença entre a linhagem selvagem e os mutantes. Nestes últimos, o número de células esteve sempre abaixo das plântulas infectadas com o grupo controle positivo.

#### **II-2.2.6.2 - Teste em folhas**

Foram testadas em folhas de tomate os onze mutantes e todos eles apresentaram apenas respostas locais, não características de patogenicidade. Eram respostas semelhantes à resposta de hipersensibilidade, isto é, manchas escuras restritas à região da inoculação da suspensão bacteriana. Eram manchas secas que não se propagaram pelo tecido foliar. Estas respostas apareceram cerca de 48 horas após o inóculo. Os onze mutantes apresentaram tal resposta, porém em intensidades diferentes. Esta mesma resposta foi apresentada também pela linhagem 289 (controle negativo). A resposta de patogenicidade apresentada pela linhagem selvagem (479Nal<sup>f</sup>) 48 horas após a inoculação se apresentou como manchas escuras, úmidas e que se propagaram pelos outros tecidos da planta, incluindo pecíolo e em alguns casos o caule.

O número de bactérias dos mutantes Mut2, Mut8 e Mut11, da linhagem selvagem (479Nal<sup>f</sup>) e do controle negativo 289Nal<sup>f</sup> encontrado nas folhas infiltradas com as suspensões bacterianas é apresentado na Figura 19. Com exceção do mutante Mut11 que não apresentou crescimento no tecido foliar durante todo o tempo amostrado, os demais mutantes apresentaram crescimento embora não tenha sido observado sintomas de patogenicidade. O mesmo ocorreu com a linhagem 289Nal<sup>f</sup> (controle negativo) não compatível com tomate. Os dois mutantes, Mut2 e Mut8, no entanto, apresentaram um crescimento retardado em relação à linhagem selvagem. Enquanto a linhagem patogênica apresentou após 24 horas um crescimento de cerca de  $10^8$  células/disco foliar de 1 cm de diâmetro, os mutantes Mut2 e Mut8 apresentaram tal valor apenas após 72 horas. Esses

UFC/plantula

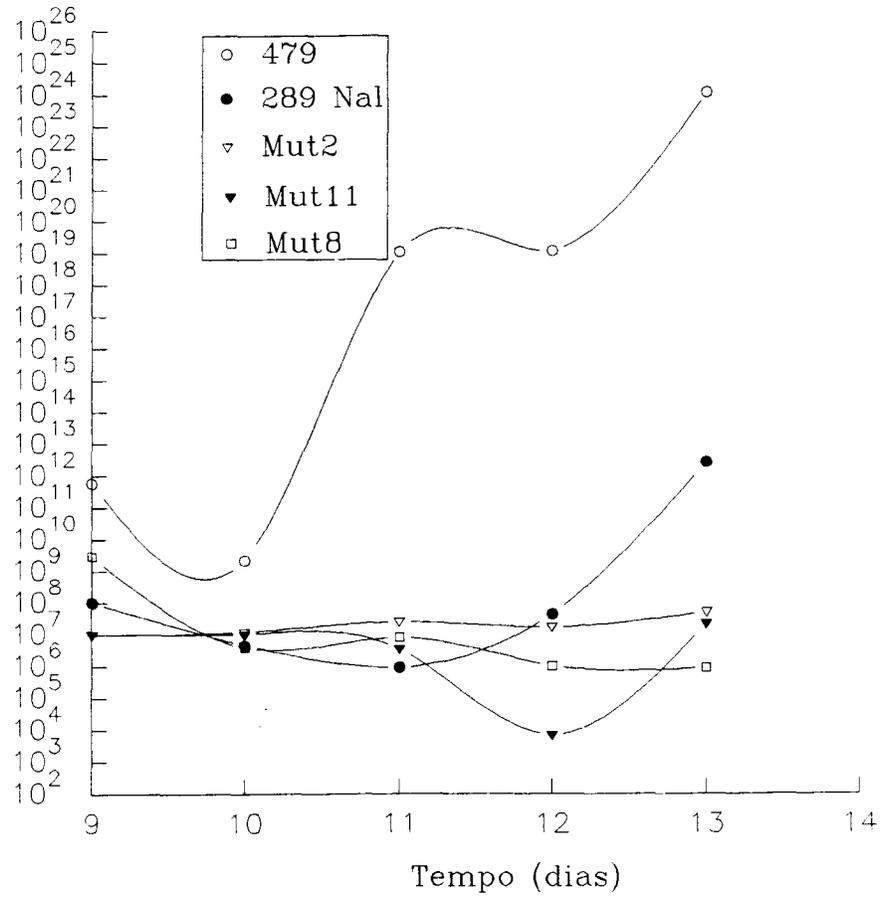


Figura 18 - Número de bactérias por plântula após nove dias de tratamento da sementes de tomate com suspensão bacteriana das linhagens 479Nal<sup>f</sup> (controle positivo), 289 (controle negativo) e dos mutantes Mut2, Mut8 e Mut11.

UFC/disco foliar

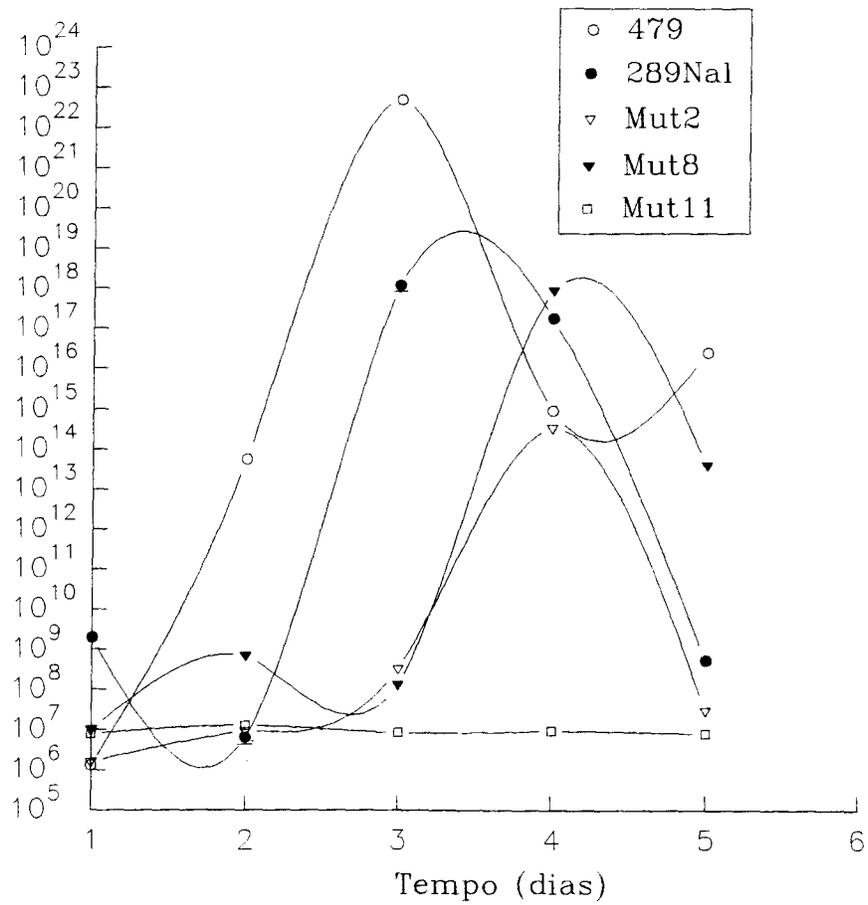


Figura 19 - Número de bactérias por disco foliar (1cm de diâmetro) de folhas de tomate infiltradas com suspensão bacteriana das linhagens 479NaI<sup>r</sup> (controle positivo), 289NaI<sup>r</sup> (controle negativo) e dos mutantes Mut2, Mut8 e Mut11.

valores foram máximos para estes mutantes enquanto a linhagem selvagem atingiu valor máximo de número de bactérias superior a  $10^{22}$  células/disco foliar (Figura 19).

### **II -2.3 - Isolamento de mutante espontâneo não patogênico**

Nos testes de patogenicidade em folhas de tomate a linhagem 479Nal<sup>f</sup> foi usada como controle positivo. Para o teste utilizava-se colônia isolada em placa para se fazer inóculo em meio líquido. As bactérias crescidas neste meio líquido foram utilizadas para inocular folhas de tomate. Num destes testes observou-se que a linhagem 479Nal<sup>f</sup> apresentava uma resposta não compatível na planta. Voltou-se à colônia isolada que dera origem ao inóculo e outros testes em sementes de tomate comprovaram a não patogenicidade. Tal mutante foi designado 479Nalsp e apresentou características semelhantes aos mutantes induzidos por Tn5, descritos neste trabalho: é prototrófico, de coloração amarela (idêntica à da linhagem selvagem).

O mutante 479Nsp foi testado em tomate e pimentão e mostrou-se não patogênico para ambos os hospedeiros tanto em testes de sementes como em folhas. No teste em folhas, assim como os demais mutantes insercionais, este mutante espontâneo apresentou resposta de hipersensibilidade.

### **II -2.4 - Perfil plasmidial da linhagem selvagem e dos mutantes não patogênicos**

Todos os mutantes não patogênicos, induzidos com Tn5 ou o mutante espontâneo, não apresentaram plasmídio. Por outro lado as linhagens 479 e 479Nal<sup>f</sup>, ambas patogênicas, apresentaram dois plasmídios de pesos moleculares bastante distintos: um com aproximadamente 31 kb e outro com 1,3 kb. O perfil dos plasmídios da linhagem 479Nal<sup>f</sup> após digestão com diferentes enzimas de restrição está representado na Figura 20.

Esta perda de plasmídios, comum a todos os mutantes não patogênicos, sejam eles espontâneos ou induzidos, sugeriu o envolvimento de plasmídios com patogenicidade. A partir destes dados decidiu-se construir um banco de plasmídios da linhagem selvagem 479Nal<sup>f</sup> com posterior complementação de alguns mutantes não patogênicos.

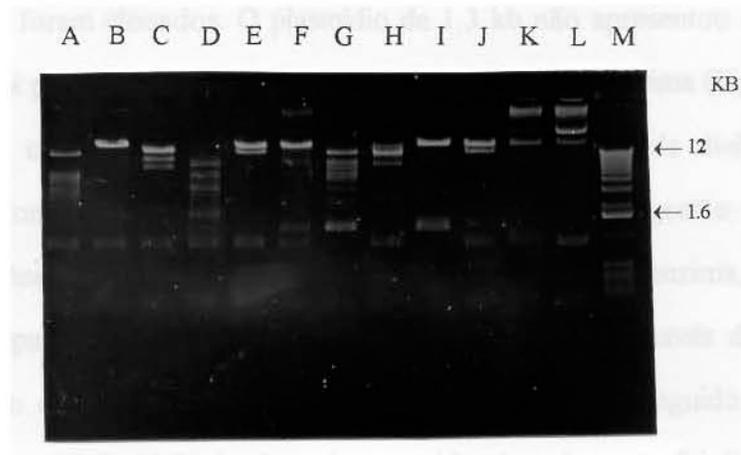


Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose 0.8% do perfil plasmidial da linhagem 479NaI<sup>f</sup> após digestão com diferentes enzimas de restrição. **M)** Marcador de peso molecular (ladder 1kb, Gibco BRL); **A)** *AccI*, **B)** *BamHI*, **C)** *EcoRI*, **D)** *HincII*, **E)** *HindIII*, **F)** *KpnI*, **G)** *PstI*, **H)** *SacI*, **I)** *SmaI*, **J)** *XbaI* e **L)** *XhoI*.

## II - 2.5 - Construção de banco do plasmídeo 31 kb da linhagem 479Nal<sup>r</sup>

A construção do banco de plasmídios da linhagem selvagem 479Nal<sup>r</sup> foi efetuada por digestão com *EcoRI*, usando-se o vetor de clonagem pUFR043. Como pode ser observado pela Figura 19, a digestão do plasmídeo maior com *EcoRI* resultou em três fragmentos, de 15, 10 e 6 kb, que foram clonados. O plasmídeo de 1.3 kb não apresentou sítios de *EcoRI*, assim sendo não foi possível cloná-lo no vetor digerido com esta enzima (Figura 20). Foram selecionados três clones representando este plasmídeo maior da linhagem 479. A confirmação da clonagem foi realizada através de extração e digestão com *EcoRI* de plasmídios de colônias aleatórias. Através de digestão com esta enzima, os fragmentos clonados foram separados por eletroforese em gel de agarose. Através da digestão com *EcoRI* o fragmento de aproximadamente 10 kb não pôde ser distinguido do vetor. Para confirmar se o clone c10 de 10 kb havia realmente sido clonado, este foi digerido com *SaII* que apresenta sítio único no vetor (Figura 15). Com esta digestão obteve-se um fragmento linear de aproximadamente 20 kb, confirmando a clonagem. Os três clones selecionados: c6, c10 e c15 apresentando, respectivamente, os fragmentos de 6, 10 e 15 kb, foram usados para transformar, isoladamente, por eletrotransformação, o mutante 479Nalsp e o mutante Mut11. Assim obteve-se as linhagens 479Nalsp/6, 479Nalsp/10, 479Nalsp/15, Mut11/6, Mut11/10 e Mut11/15 que foram testadas em sementes e folhas de tomate (como descrito nos itens 1.4). Nenhum destes recombinantes apresentou sintomas de patogenicidade em plântulas ou folhas, indicando que a complementação não ocorreu.

## II -3 - DISCUSSÃO

A mutagênese com o transposon Tn5 mostrou-se eficiente para a obtenção de mutantes não patogênicos de *X. campestris* pv. vesicatoria tendo-se obtido uma frequência de 2.5 %. Turner *et al.* (1984) usaram Tn5 para mutagenizar *X. campestris* pv. campestris e obtiveram uma baixa frequência de recombinantes ( $10^{-4}$ ) se comparada com os resultados deste trabalho. É conhecido o fato de que diferentes espécies de patógeno ou mesmo diferentes linhagens de uma mesma espécie variam amplamente na frequência com que sofrem mutações insercionais pelo transposon Tn5 (Daniels, 1989). Este fato pode explicar a alta frequência aqui encontrada. Além de diferenças de linhagens utilizadas, outro fator que pode ter desempenhado papel relevante é o vetor usado na transferência do Tn5. Neste trabalho o transposon foi transferido pelo plasmídeo F'-lac, enquanto Turner *et al.* (1984) utilizaram o plasmídeo pJB4JI (Beringer *et al.*, 1978), ambos os vetores são "suicidas" em *Xanthomonas*, isto é, não são capazes de se replicar nestes hospedeiros.

Os testes de patogenicidade mostraram-se eficientes no processo de seleção e caracterização dos mutantes. O teste em plântula pareceu-nos ideal para uma primeira etapa de seleção uma vez que se trata de um método rápido e viável para fazer a seleção dentre grande número de recombinantes. O teste de contagem do número de células em folhas mostrou-se muito sensível e capaz de diferenciar mutantes com crescimento retardado no tecido do hospedeiro, característica essa que não seria detectada apenas pela observação na planta. No teste em sementes, apenas a observação não mostrou-se eficiente pois foram observadas algumas respostas atípicas com clorose e manchas nas plântulas gerando dúvidas em relação a uma análise final da resposta. Tais dúvidas puderam ser sanadas através da contagem do número de células onde linhagens patogênicas apresentam um crescimento bastante acentuado em relação a linhagens não patogênicas.

Testes em folhas e contagem do número de células em testes de sementes foram os testes que apresentaram os melhores resultados, mais sensíveis e seguros. Através destes

testes foi possível diferenciar mutantes até mesmo pela intensidade da resposta que apresentavam nas plantas. Pela curva de crescimento pode-se acompanhar o crescimento bacteriano das linhagens que nem sempre acompanharam o desenvolvimento de lesões observáveis no tecido da planta. Um exemplo de crescimento no tecido sem apresentar sintomas foi observado pelo mutante Mut8 no teste de contagem do número de células em folhas de tomate. Apesar de não se esperar crescimento bacteriano nessa interação não compatível, resultados semelhantes foram obtidos por Melano & Cooksey (1988) com mutantes *hsv*. Aliados, o teste de folhas e sementes foram considerados os melhores para caracterizar os mutantes não patogênicos numa etapa em que o número de recombinantes a serem testados era reduzido.

Alguns mutantes apresentaram características próprias que os diferem entre si e em relação à linhagem selvagem. A não produção de pectinase pelos mutantes Mut3, Mut4, Mut10 e Mut11 é um exemplo. Outra característica singular é a auxotrofia do mutante Mut2. Estes mutantes podem ser usados para estudos que venham a revelar o papel destas deficiências na interação incompatível que tais mutantes apresentam com seus hospedeiros.

Como todos os mutantes apresentaram HR (resposta de hipersensibilidade) em tabaco (planta não hospedeira) ficou descartado o envolvimento de mutações em genes da classe *hrp* que são genes envolvidos com a virulência em plantas hospedeiras e HR em plantas não hospedeiras (Willis *et al.*, 1991).

Alguns mutantes apresentaram-se compatíveis em pimentão e não compatíveis em tomate (Mut7 e Mut9) enquanto os demais mostraram-se incompatíveis com ambos. Podemos então agrupar os mutantes em duas classes: uma formada por mutantes não patogênicos para tomate e pimentão (resultados semelhantes aos descritos por Seal *et al.*, 1990) e outra por mutantes não patogênicos apenas para um dos hospedeiros, tomate.

As características dos mutantes Tn5 e a obtenção do mutante espontâneo 479Nalsp (não patogênicos e sem plasmídios naturais da linhagem selvagem), sugerem o envolvimento de plasmídios na patogenicidade do microrganismo em questão. Como foi citado nos

resultados do trabalho em questão, todos os mutantes não patogênicos, inclusive o 479Nalsp, não apresentaram nenhum plasmídio, enquanto a linhagem selvagem apresentou dois. Moulton *et al* (1993) trabalhando com *P. syringae* pv. pisi observaram que a introdução de determinados replicons nestas bactérias levava a um rearranjo dos plasmídios nativos da linhagem. Com isto, plasmídios, ou parte deles eram perdidos e um novo perfil plasmidial era observado. No presente trabalho, para a obtenção de mutantes não patogênicos foi introduzido na linhagem selvagem um novo plasmídio, F'-*lac* contendo o transposon Tn5. Este novo plasmídio poderia, de maneira semelhante à descrita por Moulton, ter provocado a perda dos plasmídios nativos da linhagem 479Nal<sup>f</sup>. No entanto, há o mutante espontâneo 479Nalsp que também não apresenta plasmídio e que não recebeu nenhum outro replicon. Seria interessante testar a estabilidade destes plasmídios da linhagem 479Nal<sup>f</sup> ao longo de sucessivos repiques e mesmo após a introdução de diferentes replicons.

Na literatura, com exceção de genes de avirulência (Stall, *et al.*, 1996; De Feyter & Gabriel, 1991), não há descrição de genes envolvidos diretamente com a patogenicidade do gênero *Xanthomonas* que estejam em plasmídio. Mas há a possibilidade de que na linhagem empregada no presente trabalho haja algum gene plasmidial envolvido, direta ou indiretamente, com a patogenicidade.

Várias hipóteses podem ser levantadas para explicar o insucesso da complementação desses dois mutantes não patogênicos com o banco de plasmídios da linhagem selvagem. Uma delas é que a característica de patogenicidade não seja codificada por genes plasmidiais, ou seja, que a característica seja cromossômica. Há também a possibilidade de que a característica seja codificada por genes localizados no plasmídio pequeno de 1.3 kb que não foi representado pelo banco de plasmídios. Também existe a possibilidade de que a enzima usada para a construção do banco de plasmídios tenha fragmentado algum gene de interesse.

## LITERATURA CITADA

- Agrios G.N. *Plant Pathology*. 1988 - 3<sup>rd</sup> edition. Ed. Academic Press, Inc. San Diego, California.
- Alippi, A.M. 1992. Histopatología de hojas de tomate inoculadas con *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. **Agronomie**, **12**: 115-122. 1992.
- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. & Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, **215**: 403-410.
- Anderson, D.M. & Mills, D. 1985. The use of transposon mutagenesis in the isolation of nutritional and avirulence mutants in two pathovars of *Pseudomonas syringae*. **Phytopathol.**, **75**: 104 - 108.
- Arlat, M.; Gijsegem, F.; Pernollet, J.C. & Boucher, C.A. 1994. PopA1, a protein which induces a hypersensitivity-like response on specific petunia genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. **EMBO J.**, **13**: 543-553.
- 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*. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, **4**: 187-193.
- Arlat, M.; Gough, C.L.; Zischek, C.; Barberis, P.A.; Trigalet, A.; Boucher, C.A. 1992. Transcriptional organization and expression of the large *hrp* gene "cluster" of *Pseudomonas solanacearum*. **Mol. Plant- Microbe Interact.**, **5**: 187-193.
- Atkins, D.T.; Barber, C.F. & Daniels, M.J. 1987. Transformations of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* with plasmid DNA. **J. Gen. Microbiol.**, **133**: 2727-2731.
- Barny, M.A.; Guinebretière, M.-A.; Marcais, B.; Coissac, E.; Paulin, J.P. & Laurent, J. 1990. Cloning of a large gene "cluster" involved in *Erwinia amylovora* CFBP1430 virulence. **Mol. Microbiol.**, **4**: 777-786.

- Barrère, G.C.; Barber, C.E., Daniels, M.J. 1986. Molecular cloning of genes involved in the biosynthesis of the extracellular polysaccharide xanthan by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Int. J. Biol. Macromol.**, **8**: 372 - 374.
- Bauer, D.W. & Beer, S.V. 1991. Further characterization of an *hrp* gene “cluster” of *Erwinia amylovora*. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, **4** : 493- 499.
- Belleman, P. & Geider, K. 1992. Localization of transposon insertions in pathogenicity mutants of *Erwinia amylovora* and their biochemical characterization. **J. Gen. microbiol.**, **138**: 931-940
- Bennett, R.A. & Billing, E. 1978. Capsulation and virulence in *Erwinia amylovora*. **Ann. of Appl. Biol.**, **89**: 41-45.
- Beringer, J.E.; Beynon, J.L.; Buchanon-Wollaston, A.V. & Johnston, A.W.B. 1978. Transfer of the drug-resistance transposon Tn5 to *Rhizobium*. **Nature**, **276**: 633-634.
- Birboin, 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 staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, **8**: 93-99.
- Boccaro, M.; Diomez, A. Rouve, M. & Kotoujansky, A. 1988. The role of individual pectate lyase of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937 in pathogenicity on saintpaulia plants. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, **33**: 95-104
- Bonas, U.; Conrads-Strauch, J. & Balbo, I. 1993. Resistance in tomato to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is determined by alleles of the pepper-specific avirulence gene *avrBS3*. **Mol. Gen. Genet.**, **238**: 261-269.
- 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 Interact.**, **4**: 81-88.

- 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.
- Bonas, U.; Stall, R.E.; Staskawicz, B.J. 1989. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. **Mol. Gen. Genetic**, **218**: 127-136.
- Boucher, C.A.; Barberis, P.A. & Arlat, M. 1988. Acridine orange select for deletions of *hrp* genes in all races of *Pseudomonas solanacearum*. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, **1**: 282-288.
- 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.
- Bradbury, J.F.. 1984. *Xanthomonas* Dowson 1939. In: Bergey's manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. Krieg, N.R. & Holt, eds. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland.
- Bruijn, F.J. & Lupski, J.R. 1984. The use of transposon Tn5 mutagenesis in the rapid generation of correlated physical and genetic maps of DNA segments cloned into multicopy plasmids-a review. **Gene**, **27**: 131-149.
- 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 Interact.**, **4** (6): 628-632.
- Chatterjee, A.K & Starr, M.P. 1977. Donor strains of the soft-rot bacterium *Erwinia chrysanthemi* and conjugational transfer of the pectolytic capacity. **J. Bacteriol.**, **132** : 862-869.
- Chatterjee, A.K. & Vidaver, A.K. 1986. Genetics of pathogenicity factors: application of phytopathogenic bacteria. **Adv. Plant Pathol.**, **4**: 1 - 218.

- Chen, J.; Roberts, P. & Gabriel, D.W. 1994. Effects of a virulence locus from *Xanthomonas campestris* 528<sup>T</sup> on pathovars status and ability to elicit blight symptoms on crucifers. **Phytopathology**, **84**: 1458-1464
- Collmer, A.; Whalen, C.H.; Beer, S.V.; Bateman, D.F. 1982. An exopoly- $\alpha$ -D-galacturonidase implicated in the regulation of extracellular pectate lyase production in *Erwinia chrysanthemi*. **J. Bacteriol.**, **149**: 626-634.
- Cook, A.A. & Stall, R.E. 1969. Differentiation of pathotypes among isolates of *Xanthomonas vesicatoria*. **Plant Dis. Repr.**, **53**: 617-619.
- Dahlbeck, D. & Stall, R.E. 1979. Mutations for change of race in cultures of *Xanthomonas vesicatoria*. **Phytopathology**, **69**(6): 634-636.
- Daniels, M.J. 1989. Pathogenicity of *Xanthomonas campestris* towards plants. In: Hopwood, D.A. & Cahter, K.F. ed. **Genetic of Bacterial Diversity**, 1989, Academic Press.
- Daniels, M.J.; Barber, C.E.; Turner, P.C.; Cleary, W.G. & Sawczyc, M.K. 1984a. Isolation of mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* showing altered pathogenicity. **J. Gen. Microbiol.**, **130**: 2447-2455.
- Daniels, M.J. ; Barber, C.E. ; Turner, P.C.; Sawczyc, M.K.; Byrde, R.J.W. & Fielding, A.H. 1984b. Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris*. **EMBO Journal**, **3**:3323-3328.
- Daniels, M.J.; Collinge, D.B.; Dow, J.M.; Osbourn, A.E. & Roberts, I.N. 1987. Molecular biology of the interaction of *Xanthomonas campestris* with plants. **Plant Physiol. Biochem.**, **25**(3): 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.
- De Feyter, R.; Kado, C.I. & Gabriel, D.W. 1990. Small, stable shuttle vectors for use in *Xanthomonas*. **Gene**, **88**: 65-72.

- De Feyter, R. & Gabriel, D.W. 1991. At least six avirulence genes are "cluster"ed on a 90-kilobase plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. **Mol. plant-Microbe Interact.**, 4(5): 423-432.
- De Feyter, R. & Gabriel, D.W. 1991. Use of cloned DNA methylase genes to increase the frequency of transfer of foreign genes into *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. **J. Bacteriol.**, 173: 6421 - 6427.
- De Mot, R. & Vanderleyden, J. 1989. Application of two-dimensional protein analysis for strain fingerprinting and mutant analysis of *Azospirillum* species. **Can. J. Microbiol.**, 133: 1751-1758.
- Destefano, S.A.L. & Rosato, Y.B. 1991. Effect of transposon Tn5 on exopolysaccharide production by *Xanthomonas campestris*. **Rev. Brasil. Genét.**, 14(3): 599-607.
- Djordjevic, M.A.; Schofield, P.R.; Ridge, R.W.; Morrison, N.A.; Bassam, B.J.; Plasinski, J.; Watson, J. M.; Rolfe, B.G. 1985. *Rhizobium* nodulation genes involved in root hair curling (Hac) are functionally conserved. **Plant Mol. Biol.**, 4: 147-160.
- Dow, J.M. & Daniels, M.J. 199. Pathogenicity determinants and global regulation of pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. In: **Bacterial Pathogenesis of plants and animals-Molecular and Cellular Mechanisms**. Ed. Dangl, J.L. Springer-Verlag, Berlin.
- Dow, J.M.; Milligan, D.E.; Jamieson, L.; Barber, C.E.; Daniels, M.J. 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
- 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 Pathol.**, 31: 261-271.

- Downie, J.A.; Hombrecher, G.; Ma, Q.S.; Knight, C.D.; Wells, B.; Johnston, A.W.B. 1983. Cloned nodulation genes of *Rhizobium leguminosarum* determine host-range specificity. **Mol. Gen. Genet.**, **190**: 359-365.
- Dums, F.; Dow, J.M. & Daniels, M.J. 1991. Structural characterization of protein secretion genes of the bacterial phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: relatedness to secretion systems of the other gram-negative bacteria. **Mol Gen. Genet.**, **229**: 357-364.
- Ellingboe, A.H. 1982. Genetic aspects of active defense. In: wood RKS (ed) Active defense mechanism of plants. Plenum, New York, pp. 179-192.
- 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 Interact.**, **5**: 390-396.
- Fett, W.F.; Osman, S.F. & Dunn, M.F. 1987. Auxin production by plant-pathogenic pseudomonads and xanthomonads. **Appl. Environ. Microbiol.**, **53**: 1839-1845.
- Ferreira, H.; Barrientos, F.J.A.; Baldini, R.L. & Rosato, Y.B. 1995. Electrotransformation of three pathovars of *Xanthomonas campestris*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **43**: 651-655.
- Finlay, B.B. & Falkow, S. 1989. Common themes in microbial pathogenicity. **Microbiol. Rev.**, **53**: 210-230.
- Gabriel, D.W. 1986. Specificity and gene function in plant/pathogen interactions. **ASM News**, **52**: 19-25.
- Gabriel, D.W.; Burges, A. & Lazo, G.R. 1986. Gene-for-gene interactions of five cloned avirulence genes from *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* with specific resistance genes in cotton. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **83**: 6415-6419.
- Gijsegem, F.V.; Gough, C.; Zischek, C.; Niqueux, E.; Arlat, M.; Genin, S.; Barberis, P.; German, S.; Castello, P. & Boucher, C. 1995. The *hrp* gene locus of *Pseudomonas solanacearum*, which controls the production of a type III secretion system, encodes

- eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex. **Mol. Microbiol.**, **15**(6): 1095-1114.
- 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 the role of the major endoglucanase in pathogenesis. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, **1**: 275 - 281.
- Gough, C.L., Genin, S. Zischek, C. & Boucher, C.A. 1992. *hrp* genes of *Pseudomonas solanacearum* are homologous to pathogenicity determinants of animal pathogenic bacteria and are conserved among plant pathogenic bacteria. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, **5**: 384-389.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. mol. Biol.**, **166**:557.
- Harding, N.E.; Cleary, J.M.; Cabanas, D.K.; Rosen, I.G.; Kang, K.S. 1987. Genetic and physical analysis of a "cluster" of genes essential for xanthan gum biosynthesis in *Xanthomonas campestris*. **J. Bacteriol.**, **169**: 2854 - 2861.
- Heery, D.M.; Gannon, F. & Powell, R. 1990. A simple method for subcloning DNA fragments from gel slices. **Trends in Genetics**, **6**(6): 173.
- Henikoff, S. 1987. Unidirectional digestion with exonuclease III in DNA sequence analysis. **Methods in Enzymology**, **155**: 156-165.
- Heu, S. & Hutcheson, S.W. 1993. Nucleotide sequence and properties of the *hrmA* locus associated with the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 *hrp* gene "cluster". **Mol. Plant-Microbe Interact.**, **6**(5): 553-564.
- Hildebrand, D.C.; Riddle, B. 1971. Influence of environmental conditions on reactions induced by infiltration of bacteria into plant leaves. **Hilgardia**, **41**: 33-43.
- Hombrecher, G.; Gotz, R.; Dibb, N.J.; Downie, J.A.; Johnston, A.W.B.; Brewin, J. 1984. Cloning and mutagenesis of nodulation genes from *Rhizobium leguminosarum* TOM, a strain with extended host range. **Mol. Gen. Genet.**, **194**: 293-298.

- Horvath, B.; Kondorosi, E.; John, M.; Schmidt, J.; Torok, I.; Gyorgypal, Z.; Barabas, I.; Wienek, U.; Schell, J.; Kondorosi, A. 1986. Organization, structure and symbiotic function of *Rhizobium meliloti* nodulation genes determining host specificity for alfalfa. **Cell**, **96**: 335-343.
- Hu, M.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*. **J. Bacteriol.**, **174** : 2679 - 2687.
- Huang, H.-C.; Hutcheson, S.V. & Collmer, A. 1991. Characterization of the *hrp* "cluster" from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and TnphoA tagging of genes encoding exported or membrane spanning Hrp proteins. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, **4**: 469-476.
- Huynh, T.V.; Dahlbeck, D. & Staskawicz, B. 1989. Bacterial blight of soybean: regulation of a pathogen gene determining host specificity. **Science**, **245**: 1374-1377.
- Hwang, I.; Lim, S.M. & Shaw, P.D. 1992. Cloning and characterization of pathogenicity genes from *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*. **J. Bacteriol.**, **174**: 1923-1931.
- Innes, R.W.; Kuempel, P.L.; Plazinski, J.; Canter-Cremers, H.; Rolfe, B.-G.; Djordjevic, M.A. 1985. Plant factors induce expression of nodulation and host-range genes in *Rhizobium trifolii*. **Mol. Gen. Genet.**, **201**: 426-432.
- Jefferson, R.A.; Burgers, S.M. & Hirsh, D. 1986.  $\beta$ - glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **83**: 8447-8451.
- Kamdar, H.V.; Kamoun, S. & Kado, C. 1993. Restoration of pathogenicity of avirulent *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. campestris* pathovars by reciprocal complementation with the *hrpXo* and *hrpXc* genes and identification of HrpX function by sequence analyses. **J. Bacteriol.**, **175**(7): 2017-2025.

- Kamoun, S.; Cooley, M.B.; Rogowsky, P.M. & Kado, C.I. 1989. Two chromosomal loci involved in production of exopolysaccharide in *Agrobacterium tumefaciens*. **J. Bacteriol.**, **171**: 1750- 1759.
- Kamoun, S.; Kamdar, H.V.; Tola, E. & Kado, C.I. 1992. Incompatible interactions between crucifers and *Xanthomonas campestris* involve a vascular hypersensitive response: role of the *hrpX* locus. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, **5**(1): 22-33.
- 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 nonhost. **J. Bacteriol.**, **172**: 5165-5172.
- 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.; Ronald, P.C.; Dahlbeck, D. & Staskawicz, B.J. 1988. Molecular basis for evasion of plant host defence in bacterial spot disease of pepper. **Nature**, **332**: 541-543.
- Kearney, B. & Staskawicz, B.J. 1990. widespread distribution and fitness contribution of *Xanthomonas campestris* avirulence gene *avrBs2*. **Nature**, **346**: 365-366.
- Kondorosi, E.; Banfalvi, Z. & Kondorosi, A. 1984. Physical and genetic analysis of a symbiotic region of *Rhizobium meliloti*: identification of nodulation genes. **Mol. Gen. Genet.**, **193**: 445-452.
- Kotoujansky, A. 1987. Molecular genetics of pathogenesis by soft rot erwinias. **Annu. Rev. Phytopathol.**, **25**: 405-430.
- Knoop, V.; Staskawicz, B.J. & Bonas, U. 1991. Expression of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is not under the control of *hrp* genes and is independent of plant factors. **J. Bacteriol.**, **173**(22): 7142-7150.
- Laby, R.J. & Beer, S.V. 1992. Hybridization and functional complementation of the *hrp* gene from *Erwinia amylovora* strain Ea321 with DNA of other bacteria. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, **5**: 412-419.

- Lamb, C.J.; Lawton, M.A.; Dron, M. & Dixon, A. 1989. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell*, **56**:215-224.
- Leong, S.A.; Ditta, G.S. & Helinsky, D.R. 1982. Hemebiosynthesis in *Rhizobium*: identification of a cloned gene coding for g-amino levulinic acid from *Rhizobium meliloti*. *J. Biol. Chem.*, **257**: 8724 - 8730.
- Leyns, F.; Decléene, M.; Swings, J.G. & DeLey, . 1984. The host-range of the genus *Xanthomonas*. *Bot. Rev.*, **50**: 308-356
- Li, T.-H.; Benson, S.A. & Hutcheson, S.W. 1992. Phenotypic expression of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61hrp/hrm gene "cluster" in *Escherichia coli* requires a functional porin. *J. Bacteriol.*, **174**: 1742-1749.
- Lindgren, P.B. & Jacobek, J.L. 1990. Inoculation of bean with hrp mutants of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* alters susceptibility to *P. s.* pv. *phaseolicola*. (Abstr.). *Phytopathology*, **80**: 1010.
- Lindgren, P.B.; Panopoulos, N.J., Staskawicz, B.J. & Dahlbeck, D. 1988. Genes required for pathogenicity and hypersensitivity are conserved and interchangeable among pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **21**: 499-506.
- Lindgren, 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.
- Ma, Q.-S.; Chang, M.-F., Tang, J.-L., Feng, J.-X.; Fan, M.-J.; Han, B. & Liu, T. 1988. Identification of DNA sequences involved in host specificity in the pathogenesis of *Pseudomonas solanacearum* strain T2005. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **1**: 169-174.
- Maniatis, T.; Fritsh, E. F. & Sambrook, J. 1982. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA.

- Maligna, P.; Sz-Breznovits, A. & Marton, L. 1973. Streptomycin resistant plants from callus culture of haploid tobacco. **Nature**, **244**: 29-30.
- 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 hipocótilos de tomateiro. **Fitopatol. Brasil**, **20**: 244-247.
- Melano, V.J. & Kooksey, D.A. 1988. Development of host range mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. **App. Environ. Microbiol.**, **54**: 884-889.
- Mills, D. 1985. Transposon mutagenesis and its potential for studying virulence genes in plant pathogens. **Ann. Rev. Phytopathol.**, **23**: 297-320.
- Mills, D. & Mukhopadhyay, P. 1990. Organization of the *hrp* M locus of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Pages 78-81 in: ***Pseudomonas: Biotransformation, Pathogenesis, and Evolving Biotechnology***. Silva, S.; Chakrabarty, A.M.; Iglewski, B.; and Kaplan, S., eds. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Minsavage, G.V.; Dahlbeck, D.; Whalen, M.C.; Kearney, B.; Bonas, U.; Staskawicz, B.J. & Stall, R.E. 1990. Gene-for-gene relationship specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria-pepper interactions. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, **3**(1): 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.
- Moulton, P.J.; Vivian, A.; Hunter, P.J. & Taylor, J.D. 1993. Changes in cultivar-specificity toward pea can result from transfer of plasmid RP4 and other incompatibility group P1 replicons to *Pseudomonas syringae* pv. *psis*. **J. Gen. Microbiol.**, **139**: 3149-3155.

- Murashigue, T. & Skoog, S. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, **15**: 473 - 497.
- Napoli, C. & Staskawicz, B.J. 1987. Molecular characterization and nucleic acid sequence of an avirulence gene from race 6 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. **J. Bacteriol.**, **169**: 572-578.
- Nishimura, A.; Morita, M.; Nishimura, Y. & Sugino, Y. 1990. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. **Nucleic Acid Research**, **18**: 6169.
- Niepold, F.; Anderson, D. and Mills, D. 1985. Cloning determinants of pathogenesis from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **82**: 406 - 410.
- Patil, S.S.; Hayward, A.C. & Emmons, R. 1974. An ultraviolet induced non-toxigenic mutanat of *Pseudomonas phaseolicola* of altered pathogenicity. **Phytopathology**, **64**: 590-595.
- Pearson, W.R. 1990. Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. **Methods in Enzymology**, **183**: 63-99
- Pérombelon, M.C.M.; Kelman, A. 1982. Ecology of the soft rot erwinias. **Ann. Rev. Phytopathol.**, **18**: 361-387.
- Ramirez, M.E.; Fucikovsky, L.; Garcia-Gimenez, F.; Quintero, R. & Galindo, E. 1988. Xanthan gum production by altered pathogenicity variants of *Xanthomonas campestris*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **29**: 5-10.
- Ronald, P. & Staskawicz, B. 1988. The avirulence gene *avr* BS1 from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* encodes a 50-Kd protein. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, **5**: 191- 198.
- Rudolph, K. 1978. A host specific principle from *Pseudomonas phaseolicola* (Burkh.) Dowson, inducing watersoaking in bean leaves. **Phytopathology**, **93**: 218-226.

- Salch, Y.P. & Shaw, P.D. 1988. Isolation and characterization of pathogenicity genes of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **J. Bacteriol.**, **170**: 2584-2591.
- Salmond, G.P.C. & Reeves, P.J. 1993. Membrane traffic wardens and protein secretion in Gram-negative bacteria. **T.I.B.S.**, **18**: 7-12.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sansonetti, P.J.; Kopecko, D.J. & Formal, S.B. 1982. Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. **Infect. Immun.**, **35**: 852-860. 1982.
- Schofield, P.R.; Ridge, R.W.; Rolfe, B.G.; Shine, J.; Watson, J.M. 1984. Host-specific nodulation is encoded on a 14 kb DNA fragment in *Rhizobium trifolii*. **Plant Mol. Biol.**, **3**: 3-11.
- Schulte, R & Bonas, U. 1992. Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *Hrp* gene "cluster", which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato., is plant inducible. **J. Bacteriol.**, **174**: 815- 823.
- 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.J.; Settes, 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 pathogenicity. **Mol Plant-Microbe Interact.**, **1**: 39-45.
- Sow, P. & Demain, A.L. 1979. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRLL B-1459. **App. Environ. Microbiol.**, **31**: 1186-1192.
- 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 strains are "cluster"ed in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Intern. J. Syst. Bacteriol.**, **44**(1): 47-53.

- Stall, R.E.; Loschke, D.C. & Jones, J.B. 1986. Linkage of copper resistance and avirulence loci on a self transmissible plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology**, **76**: 240 - 243.
- 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**: 661-667.
- Staskawicz, B.J.; Bonas, U.; Dahlbeck, D.; Huynh, T.; Kearney, B.; Ronald, P. & Whalen, M. 1988. Molecular determinants of specificity in plant-bacteria interactions, p. 124-130. In: N.T. Keen, T. Kosuge, and L.L. Walling (ed.). Physiology and biochemistry of plant-microbial interactions, American Society of Plant-Physiologists, Rockville, Md.
- 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.; Dahlbeck, D.; Keen, N. T.; Napoli, C. 1987. Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. **J. Bacteriol.**, **169**: 5789- 5794.
- Steinberger, E.M. & Beer, S.V. 1988. Creation and complementation of pathogenicity mutants of *Erwinia amylovora*. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, **1**: 135-144.
- Swanson, J.; Kearney, B.; Dahlbeck, D. & Staskawicz, B. 1988. Cloned avirulence gene of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* complements spontaneous race-change mutants. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, **1**: 5-9.
- Swarup, S ; De Feyter, R.; Breansky, R.H. & Gabriel, D.W. 1991. A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *Xanthomonas campestris* to elicit cancerlike lesions in citrus. **Phytopathology**, **81**: 802- 809.
- Tamaki, S.D.; Dahlbeck, D.; Staskawicz, B.J. & Keen, N.T. 1988. Characterization and expression of two avirulence genes cloned from *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. **J. Bacteriol.**, **170**: 4846-4854.

- 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.
- Tharaud, M.; Menggad, M. ; Paulin, J.P. & Laurent, J. 1990. Virulence, growth, and surface characteristics of *Erwinia amylovora* mutants with altered pathogenicity. **Microbiology**, **140**: 659-669.
- Thorne, L.; Tansey, L. & Pollock, T.J. 1987. "cluster"ing of mutations blocking synthesis of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. **J. Bacteriol.**, **169**: 3593 - 3600.
- Turner, P.; Barber, C. & Daniels, M.J. 1984. Behaviour of the transposons Tn5 and Tn7 in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Mol. Gen. Genet.**, **195**: 101-107.
- Turner, P.; Tansey, L. & Pollock, T.J. 1987. "cluster"ing of mutations blocking synthesis of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. **J. Bacteriol.**, **169**: 3593- 3600.
- Vanneste, J.L.; Paulin, J.-P. & Expert, D. 1990. Bacteriophage Mu as a genetic tool to study *Erwinia amylovora* pathogenicity and hypersensitive reaction on tobacco. **J. Bacteriol.**, **172**: 932-941
- Vauterin, L.; Hoste, B.; Kersters, K. & Swings, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. **J. Syst. Bacteriol.**, **45** (3): 472-489.
- Vauterin, L.; Swings, J.; Kersters, K.; Gillis, K.; Hildebrand, D.C.; Stead, D.E.; Cliverolo, E.L.; Hayard, A.C.; Maraite, H.; Stall, R.E.; Vidaver, A.K. & Bradbury, J.F. 1990. Towards an improved taxonomy of *Xanthomonas*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, **40**: 312-316.
- Vaulterin, L.; Swings, J. Kersters, K. 1991. Grouping of *Xanthomonas campestris* patovars by SDS-PAGE of proteins. **J. Gen. Microbiol.**, **137**: 1677-1687.
- Vauterin, L.; Vantomme, R.; Pot, B.; Hoste, B.; Swings, J. & Kersters, K. 1990. Taxonomic analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *begoniae* and *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* by means of phytopathological, phenotypic, protein