

2005



# CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO COBRE EM *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*

**BC/22213**  
**IB/80151**

*Manoel de Barros e Azevedo Ramos*

**Georgia de Barros e Azevedo Ramos**

Trabalho que corresponde à redação final defendida pelo (a) candidato (a) *Georgia de Barros e Azevedo Ramos* pela Comissão Julgadora.

*Yoko Bomura Rosato*

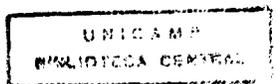
Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Yoko Bomura Rosato

Campinas - SP  
1994

T/UNICAMP

Az25<sub>c</sub>



UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	7/UNICAMP
	A2 2SC
V.	0 Ex.
TCM	22.213
PROD.	286/94
C	0 V
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	12/08/94
N.º CPJ	

CM - 00059995-4

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Yoko Bomura Rosato, pela confiança e oportunidade de realização de um trabalho sob sua orientação e pela contribuição na minha formação científica;

À Dra. Laura Ottoboni, a Profa. Dra. Anete Pereira de Souza e ao Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira, pela análise prévia desse trabalho e pelas valiosas sugestões apresentadas;

Ao Prof. Dr. Carol Bender, da Universidade de Oklahoma, EUA, por ter gentilmente cedido as sondas do gene de resistência ao cobre, contribuindo muito para este trabalho;

À Profa. Dra. Susana Novaes, do Departamento de Química da UNICAMP, pela análise de Espectroscopia de Imagem de Elétrons das células de *X.c. vesicatoria*;

Ao Prof. Dr. José Martins pelo uso do espectrofotômetro de absorção atômica, pertencente ao Instituto de Química;

À Profa. Dra. Maria Alice, pela ajuda no protocolo de preparação das células para Microscopia Eletrônica de Transmissão e pelo uso do seu laboratório;

Ao Dr. Júlio Rodrigues Neto, do Instituto Biológico, pelas inúmeras linhagens utilizadas neste trabalho;

Aos Profs. Drs. Paulo Arruda, Otavio Henrique Pavan, Ana Maria Espin e Solange Farah, pelas facilidades concedidas no uso de equipamentos e materiais de seus laboratórios, sempre que foi necessário;

Aos Profs. Wanderley Dias da Silveira, Maricilda Pallandi de Mello e Anete Pereira de Souza, pela participação no exame de qualificação e pelas sugestões apresentadas;

As meninas da secretaria do CBMEG, Tânia e Sandra, pela inestimável ajuda sempre que precisei e as secretárias da Genética, Sílvia e Teresa, pela ajuda em todos os passos burocráticos deste trabalho;

Ao Wilson e Sandra, por toda ajuda prestada na confecção dos meios de cultura, vidrarias e pela cooperação nos momentos de "sufoco" deste trabalho;

As colegas de laboratório e de batalha diária Rejane, Susi, Valéria Batista, Sandra Eugênia, Regina e Lyriam, pela convivência, discussões e ajuda prestada durante o desenvolvimento desse trabalho. Em especial à Regina pela ajuda na finalização das tabelas;

Aos amigos Andréa, Lisandro e Henrique, pela ajuda durante a parte final deste trabalho e pelos momentos divertidos e de boas gargalhadas no laboratório;

À Andréa Pimenta, que mesmo distante, sempre esteve presente participando dos resultados;

Ao meu companheiro de bancada ED, principalmente pela amizade, mas também por ter me apresentado a mega cidade de Tatuí e pelas valiosas discussões dos resultados obtidos ao longo desse trabalho;

À Sandra Eugênia, pela ajuda na confecção final das fotos, mostrando ter uma paciência japonesa;

Aos amigos Sílvia, Édson, Germano, Marymar, Gonçalo, M<sup>a</sup> Elena, Andrés, Dante, Berenice, André e Márcio, pela alegre convivência durante esses anos de CBMEG;

Ao pessoal da área médica, principalmente a Marcela, Edi e Rachel, por tudo;

Ao Fernandinho, pela valiosa amizade, pela calma demonstrada para socorrer na hora do desespero quando nada dava certo, pelas discussões dos resultados e por ter me apresentando aos professores da Química, que foram muito importantes neste trabalho;

À Rachelzinha, pela amizade, pelas discussões produtivas e pelos momentos de descontração ao longo deste trabalho;

**A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho**

**Ao Paulo e Claudia, por terem me introduzido na vida campineira e com quem eu sempre pude contar prá tudo;**

**À minha grande amiga Vilma e sua família, pela sua amizade e ajuda demonstrada sempre quando precisei;**

**À minha família, que sempre me incentivou, obrigado por todo apoio e carinho!**

**E ao Max, meu marido, grande amigo e companheiro, que sempre esteve presente, mesmo a mais de 400 Km de distância, pela paciência, apoio, colaboração e que nunca deixou perder o Encanto;**

**À CAPES, FAEP e ao Max, pelo apoio financeiro.**

## ÍNDICE

ÍNDICE.....	iv
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ABREVIACÕES.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1. Fitopatogenicidade.....	3
2.2. Resistência a metais pesados.....	4
2.3. Resistência ao cobre.....	5
2.3.1. Mecanismos de resistência.....	9
2.3.1.1. Indução do gene.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Linhagens bacterianas.....	13
3.2. Meios de Cultura.....	17
3.3. Determinação do nível de resistência ao cobre.....	18
3.4. Extração de DNA total.....	18
3.5. Extração de DNA plasmidial.....	19
3.6. Purificação em Cloreto de Césio.....	19
3.7. Conjugação.....	20
3.8. Digestão com enzimas de restrição.....	21
3.9. Experimento de Hibridização.....	21
3.9.1. Transferência alcalina.....	21
3.9.2. Marcação das sondas de DNA.....	22
3.9.3. Hibridização.....	23
3.9.4. Detecção da hibridização.....	23

3.10. Perfil plasmidial das linhagens resistentes ao cobre.....	24
3.11. Clonagem.....	24
3.11.1. Ligação DNA-vetor.....	24
3.11.2. Transformação e seleção dos transformantes.....	25
3.12. Eletrotransformação.....	25
3.13. Mecanismo de resistência.....	26
3.13.1. Digestão ácida das bactérias.....	26
3.13.2. Leitura no espectrofotômetro de absorção atômica.....	26
3.13.3. Preparação de bactérias para microscopia eletrônica de transmissão.....	27
3.13.4. Extração de proteínas totais para eletroforese em SDS-PAGE.....	29
3.13.4.1. Extração, aplicação das amostras e eletroforese.....	29
3.13.4.2. Coloração do gel de poliacrilamida com prata.....	30
3.13.5. Indução do gene de resistência ao cobre.....	31
4. RESULTADOS.....	32
4.1. Determinação do nível de resistência ao cobre.....	32
4.2. Conjugação.....	35
4.3. Detecção do gene de resistência.....	35
4.4. Perfil plasmidial.....	40
4.5. Clonagem molecular.....	42
4.6. Eletrotransformação.....	46
4.7. Mecanismo de resistência.....	49
4.7.1. Medida de acumulação de cobre.....	50
4.7.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	50
4.7.3. Perfil de proteínas totais das linhagens de <i>Xcv</i> .....	53
4.7.4. Indução do gene.....	55
5. DISCUSSÃO.....	57
6. CONCLUSÃO.....	68

7. BIBLIOGRAFIA..... 71

## RESUMO

Linhagens de dezoito patovares de *Xanthomonas campestris*, foram estudadas quanto aos seus níveis de resistência ao cobre e todas apresentaram, com exceção do patovar *vesicatoria*, sensibilidade ao metal. Quatorze linhagens do patovar *vesicatoria* foram testadas e a resistência ao cobre foi demonstrada, em um grau variável, por 40,9% das linhagens, indicando a dispersão da característica nos isolados brasileiros de *Xanthomonas*.

Visando a localização do gene de resistência ao metal, DNA plasmidial e genômico foram hibridizados com as sondas referentes ao gene de resistência ao cobre, isoladas de *X. campestris* pv *vesicatoria* (Bender, C., EUA). Essas sondas reconheceram os isolados brasileiros 310, 411 e 484 como portadores de resistência em plasmídios. Além desses, o gene também foi detectado nos plasmídios dos patovares *melonis* e *cassavae*, patogênicos para cultivares pertencentes as famílias Cucurbitaceae e Euphorbiaceae, respectivamente.

Foi identificado polimorfismo de tamanho e restrição através do perfil de restrição dos plasmídios codificadores da resistência. O plasmídio nativo da linhagem 484, pRCV48, mostrou ser conjugativo, o que permite a dispersão do determinante de resistência para outros patovares. Esse plasmídio foi escolhido para experimentos de clonagem.

Um inserto de 3,1 kb, que mostrou hibridização com a sonda 2A.1, foi clonado no vetor pMFY40, originando o plasmídio pCX. O inserto foi introduzido em *E.coli*, a qual foi selecionada até um nível de 200 µg/ml de cobre.

O plasmídio pCX também foi utilizado para eletrotransformar uma linhagem sensível de *Xcv*. Essa linhagem transformada mostrou um nível baixo de resistência, possivelmente porque o gene estava incompleto. Houve integração do pCX no cromossomo das células transformadas, o que foi confirmado por hibridizações.

Através da mudança de coloração da linhagem 484 quando crescida em meio com cobre, supôs-se um sistema de acumulação como mecanismo de resistência ao metal. Isto foi confirmado por leitura em espectrofotômetro de absorção atômica e análises de microscopia eletrônica de transmissão. O gene de resistência mostrou ser indutível, apresentando uma fase lag de 12 horas e, a análise do perfil de proteínas totais da linhagem 484, sugere a possibilidade de uma proteína de 164 kDa estar envolvida na resistência ao metal.

## ABSTRACT

The strains of eighteen pathovars of *Xanthomonas campestris*, were tested in relation to copper resistance and all of them, except the pathovar *vesicatoria*, showed sensitivity. Fourteen strains of *pv vesicatoria* were re-tested and copper resistance, in variable degree, was showed by 40,9% strains indicating the dispersal of this characteristic in Brazilian *Xanthomonas* isolates.

In order to locate the metal resistance gene, plasmidial and genomic DNAs were hybridized with copper resistance probe (isolated by C. Bender, USA) for detection of gene in *Xanthomonas campestris pv vesicatoria*. These probes recognized the Brazilian isolates 310, 411 e 484 which showed that it is plasmid-determined resistance. The resistance was also detected in pathovars *melonis* and *cassavae*, pathogenics to the cultivars belong to the family Cucurbitaceae and Euphorbiaceae, respectively.

The restriction profile of copper-resistant plasmid showed that there was polymorphism in size and in restriction digests profile. Also, the plasmid pRCV48, native from the strain 484, was self-transmissible, wich might allow the dispersion of the resistance determinant to others pathovars. These plasmid was chosen for cloning experiments.

One insert of 3,1 kb, which showed hybridization to the 2A probe, was cloned in the vector pMFY40, originating the plasmid pCX. The insert was introduced in *E.coli* which was selected at 200  $\mu\text{g/ml}$  of copper.

The pCX plasmid was also used to electrotransform one copper sensitive strain of *Xcv*, which showed low level of resistance, possibly because the gene was incomplete. In *X.campestris* transformed cells, there was integration of the plasmid into the chromosome, which was confirmed by hybridization.

The strain 484 showed changes in the colony color when growing in copper-medium suggesting accumulation of the metal. This accumulation was also detected in an atomic absorption spectrophotometer and in a transmission electronic microscopy. The resistance gene was inducible showing a lag phase of 12 hours and the total protein profile of the strain 484 suggested the possibility that a 164 kDa protein might be involved in the resistance mechanism.

**ABREVIACES**

<b>EDTA</b>	cido etilenodiaminotetractico
<b>PEG</b>	polietileno glicol
<b>pb</b>	pb
<b>kb</b>	quilobases
<b>rpm</b>	rotaes por minuto
<b>SDS</b>	dodecil sulfato de sódio
<b>SDS-PAGE</b>	eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
<b>Tris</b>	tris-(hidroximetil)-aminometano
<b>pRCV48</b>	plasmídio de resistência ao cobre da linhagem 484 de <i>X.c. pv vesicatoria</i>
<b>pRCV31</b>	plasmídio de resistência ao cobre da linhagem 310 de <i>X.c. pv vesicatoria</i>
<b>pRCV41</b>	plasmídio de resistência ao cobre da linhagem 411 de <i>X.c. pv vesicatoria</i>
<b>pRSCu</b>	plasmídio de resistência ao cobre da linhagem RefSm de <i>X.c. pv campestris</i>
<b>pCX</b>	plasmídio de resistência ao cobre de <i>X.campestris</i>
<b>CMI</b>	concentrao mínima inibitória
<b>V</b>	volume
<b>CIP</b>	"Phosphatase Calf Intestinal"
<b>kV</b>	quilovolts

## 1. INTRODUÇÃO

Em um ambiente natural, plantas são expostas a uma série de fatores físicos ou biológicos que podem provocar desde pequenos danos até doenças mais severas. Dentre os fatores biológicos, destacam-se as bactérias fitopatogênicas que desenvolvem uma relação complexa com seu hospedeiro.

A mancha bacteriana é uma doença causada em folhas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) e pimentão (*Capsicum annuum* L.), devido à ação da bactéria fitopatogênica gram- negativa *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* (Xcv). Esta doença causa perdas na produção dessas colheitas, acarretando grandes prejuízos econômicos. Os sintomas nas folhas infectadas, em interações compatíveis, aparecem como pequenas manchas escuras rodeadas por estreitos halos amarelos. Nos frutos, a doença se inicia como manchas amarelas que, posteriormente, passam a ter coloração escura e estrutura irregular. (Agrios, 1989).

Atualmente, compostos a base de sais de cobre, são utilizados de uma forma rotineira na agricultura para controle de infecções provocadas por *Xanthomonas campestris*. Como consequência, linhagens resistentes ao cobre têm sido selecionadas. Independente deste fato, estes compostos continuam sendo aplicados, juntamente com fungicidas, primeiro por falta de alternativas existentes e, segundo, por ainda possuírem ação contra fitopatógenos, mesmo com eficiência reduzida.

Estudos na área de fitopatologia indicam que a mancha bacteriana provocada por Xcv, é de ocorrência generalizada nas plantações de tomate e pimentão no Estado de São Paulo. O interesse de se estudar a genética da resistência ao cobre nestas bactérias, vem do fato de que compostos cúpricos são utilizados de modo indiscriminado em regiões agrícolas do Estado (Rodrigues-Neto, comunicação pessoal).

Os genes de resistência a metais pesados geralmente são encontrados em plasmídios, transposons e, com uma menor frequência, em cromossomos (Sedlmeier &

Altenbuchner, 1992). Os genes de resistência ao cobre já foram detectados em isolados de *Pseudomonas syringae* (Bender & Cooksey, 1987) e *Xanthomonas* (Bender, 1990).

O presente trabalho teve por objetivo caracterizar a resistência ao cobre em isolados brasileiros de *Xcv*, determinando:

- (1) o nível de resistência ao cobre em *Xcv* e em outros patovares de *Xanthomonas*,
- (2) dispersão do gene de resistência em outras linhagens bacterianas que não *Xcv*,
- (3) localização plasmidial ou cromossômica do gene de resistência ao cobre;
- (4) clonagem do gene de resistência ao cobre.
- (5) mecanismo de resistência ao metal;

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As interações entre patógenos bacterianos e plantas são bastante complexas e vários estudos relacionados a genes de patogenicidade têm sido realizados (Turner et al., 1985; Dixon & Lamb, 1990; Seal et al., 1990; Minsavage et al., 1990; Beaulieu et al., 1991). Para um microrganismo ter sucesso no processo infectivo é necessário ocorrer adesão de suas células ao tecido da planta, transposição de barreiras existentes, inativação dos genes de defesa encontrados no hospedeiro, e, em alguns casos, produção de toxinas e enzimas extracelulares que possam facilitar a entrada no tecido vegetal. Por sua vez, plantas podem produzir moléculas conhecidas como elicitores que podem induzir respostas de defesa no tecido da planta. Dessas substâncias tóxicas, destacam-se as fitoalexinas, substâncias antimicrobianas de largo espectro, que são acumuladas em quantidades suficientes para restringir o desenvolvimento do patógeno (Dixon & Lamb, 1990). Algumas respostas de defesa são limitadas ao local de infecção, enquanto outras, como produção de inibidores de proteinases, ocorrem sistematicamente em regiões distantes ao local do estímulo inicial (Bowles, 1990).

### 2.1. Fitopatogenicidade

As bactérias fitopatogênicas gram-negativas dividem-se em quatro gêneros: *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. Em 1990, Vauterin et al. (1990) classificaram a espécie *Xanthomonas campestris* em 143 patovares. O termo patovar é utilizado para diferenciar, intraespecificamente, linhagens patogênicas para determinadas plantas hospedeiras.

Um dos patovares mais estudados e utilizado como modelo para estudos a nível molecular é o *campestris*, causador da podridão negra em crucíferas. O estudo da genética molecular desse patovar têm apresentado resultados estimuladores sobre os

mecanismos e estratégias envolvidos na patogenicidade. Vários genes, como o gene da goma xantana (Barrere et al., 1986; Harding et al., 1987), genes de enzimas extracelulares (Dow et al., 1987) e genes também envolvidos na patogenicidade em plantas, mas com funções ainda desconhecidas (Daniels et al., 1984; Turner et al., 1985; Daniels et al., 1988) já foram clonados e continuam sendo pesquisados.

O patovar *vesicatoria* é o agente causal da mancha bacteriana em tomates e pimentões. Esta doença é de ocorrência generalizada no Estado de São Paulo, provocando perdas irreparáveis para a produção. Os frutos ficam inutilizados para o comércio, as folhas infectadas caem e as sementes contaminadas funcionam como veículo de transmissão do patógeno para diferentes regiões (Rodrigues-Neto et al., 1984). A entrada da bactéria na planta ocorre via aberturas naturais como estômatos, ou por feridas no tecido vegetal.

Diversos genes, como por exemplo, genes de avirulência (Swanson et al., 1988; Ronald & Staskawicz, 1988; Minsavage et al., 1990), genes descritos como *hrp* - "host range and pathogenicity" e genes especificamente envolvidos com o desenvolvimento da doença (Shaw et al., 1988; Seal et al., 1990), já foram clonados.

## 2.2. Resistência a metais pesados

Várias linhagens bacterianas contém determinantes de resistência a metais pesados, como  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Ag}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ , e  $\text{Zn}^{+2}$ , localizados em plasmídios e transposons (Silver, 1992). Genes responsáveis pela captura de íons são expressos constitutivamente e, quando há aumento do nível desses íons metálicos, este sistema de captura não é desligado. Como estes cátions são transportados para dentro das células, podem interferir nas funções normais de outros cátions e, conseqüentemente, da própria célula (Nies, 1992). Desta forma, a evolução de determinantes de resistência a metais pesados foi crucial para a sobrevivência de

diversas bactérias. Os principais mecanismos de resistência podem ser assim enumerados: (1) sequestro intra ou extra-celular por componentes que se ligam a metais; (2) sistema de efluxo de cátions ou de ânions, através de um processo de transporte através da membrana, codificados por plasmídios bacterianos; (3) conversão enzimática de uma forma tóxica de um íon para uma forma menos tóxica e (4) diminuição da afinidade ao metal no sítio reativo na célula. Segundo Nies (1992), o sistema de componentes que se ligam a metais é mais comum em eucariotos, enquanto em procariotos o efluxo de íons é o mais encontrado.

Em *Alcaligenes eutrophus*, dois grandes plasmídios são responsáveis pela resistência a metais pesados. O plasmídio pMOL28 de 163 kb codifica resistência a cromato, cobalto e níquel por um sistema de efluxo dependente de energia. Em outro sistema de efluxo, independente do anterior, é codificado resistência a cádmio, cobalto e zinco pelo plasmídio pMOL30 de 238 kb (Nies & Silver, 1989b). Pequenas proteínas ricas em cisteínas, e semelhantes a metalotioneínas de mamíferos, foram descritas em *Pseudomonas putida* (Higham et al., 1984) como responsáveis pela resistência a cádmio. As metalotioneínas são proteínas de baixo peso molecular, com um alto conteúdo de cisteína (cerca de 30%), e com capacidade seletiva de se ligar a íons metálicos. Genes de resistência a mercúrio foram clonados de bactérias gram-negativas e gram-positivas, tendo todos um mecanismo de resistência comum. Íons de mercúrio são sequestrados por proteínas que se ligam ao mercúrio, transportadas para o interior da célula e reduzidos para uma forma menos tóxica ( $Hg^0$ ) e altamente volátil, detoxificando a célula (Sedlmeier & Altenbuchner, 1992).

### **2.3. Resistência ao cobre**

Uma das maneiras empregadas para combater bacteriose em plantas é a utilização de bactericidas a base de cobre. O uso da "Mistura Bordeaux" data do século

XIX, onde a combinação de cobre e cal impedia o desenvolvimento de doenças provocadas por fungos em parreiras localizadas na Europa. Novas substâncias foram introduzidas para controle de doenças, sendo iniciado o uso de antibióticos em 1950 (Agrios, 1989).

A mancha bacteriana, provocada por *Xcv*, é uma doença difícil de se combater principalmente em ambientes de clima úmido e quente, pois propiciam condições adequadas para desenvolvimento da bactéria. Inicialmente, foram utilizados compostos à base de cobre associados com o antibiótico estreptomicina, como agentes antimicrobianos. Mas logo se observou a ineficácia dessa combinação, devido ao desenvolvimento de linhagens resistentes ao antibiótico (Stall & Thayer, 1962). No caso de *Erwinia amylovora*, a resistência ao antibiótico parece ser devido a mutações presentes no cromossomo dessas bactérias (Coplin, 1989). Como compostos de cobre sozinhos ou em combinação com mancozeb (composto orgânico sulfuroso que contém zinco) se mostraram ainda eficazes na ação contra bactérias, eles permanecem sendo bastante utilizados nas plantações atuais (Jones et al., 1991). Cooksey, em 1988, comprovou uma redução significativa da infecção por *Pseudomonas syringae* pv *tomato* em plantas tratadas com Kocide (hidróxido de cobre) e que foram coinoculadas com um mutante não patogênico e altamente resistente ao cobre e uma linhagem patogênica, mas sensível ao metal. Em recente trabalho, Lee et al. (1993) demonstraram que bactericidas a base de cobre suplementados com ferro aumentam a toxicidade contra *Xanthomonas campestris* pv *juglandis*, espécie patogênica para nozeiras. Os íons de ferro competem com os sítios de ligação de cobre nas proteínas que se ligam a esse metal e também provocam a diminuição do pH da solução. Com o pH baixo, os íons de cobre são liberados em solução e inibem o crescimento das bactérias.

A forte pressão de seleção, promovida pelo uso indiscriminado destes compostos, favoreceu o aparecimento de linhagens resistentes ao cobre. Essa resistência parece estar envolvida com a inativação do bactericida ou com o impedimento de sua

entrada na célula. Uma vez estabelecida essa resistência, ela pode ser selecionada nas populações bacterianas.

Marco & Stall (1983) foram um dos primeiros a descreverem resistência ao cobre em *Xcv* em linhagens isoladas na Flórida e a partir de então, vários trabalhos foram publicados relatando resistência em outros organismos (Bender & Cooksey, 1986; Bender & Cooksey, 1987; Cooksey, 1987; Erardi et al., 1987; Nies & Silver, 1989).

Em geral, a característica de resistência a metais está associada com plasmídios, mas há exceções, como na resistência a mercúrio descrito em *Bacillus sp.* e *Thiobacillus sp.* Os determinantes de resistência estão localizados no cromossomo destas bactérias (Silver & Walderhaug, 1992).

Ishihara et al. (1978) descreveram a característica de resistência ao cobre em plasmídios conjugativos de *E. coli*, sensíveis a temperatura e resistentes ao antibiótico canamicina. A resistência ao metal, nessas linhagens, estaria relacionado com o desaparecimento de uma proteína da membrana externa. Assim, a penetração de substâncias hidrofílicas de baixo peso molecular, incluindo o cobre, seriam inibidas. Linhagens selvagens de *E. coli* se mostraram cinco vezes menos resistentes do que linhagens isoladas de porcos, cuja dieta era suplementada com sulfato de cobre. Estas linhagens possuem o plasmídio conjugativo pRJ1004 de 78 MDal, que permitia a tolerância a 20mM de sulfato de cobre (Rouch et al., 1985). Através de mutagênese com transposon, foi determinado neste plasmídio, a presença de pelo menos 4 genes envolvidos na resistência ao cobre (pcoARBC).

Nas bactérias fitopatogênicas *Pseudomonas syringae* pv *tomato* e *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* a resistência também está presente no plasmídio pPT23D de 35 kb (Bender & Cooksey, 1986) e pXV10 de 190 kb (Bender et al., 1990), respectivamente. Ambos os plasmídios são conjugativos, sendo que o último mostrou ter um amplo espectro de hospedeiros, conjugando com diversos pv de *Xanthomonas*. É

provável que estes pv tenham homologia nos fatores cromossômicos necessários para replicação e manutenção do plasmídio. Genes de Cu<sup>r</sup> do plasmídio pXV10, de isolados de *X.c. pv vesicatoria* do estado de Oklahoma nos EUA, têm homologia de sequência com o plasmídio pXvCu, isolado na Flórida (Stall et al., 1986), indicando forte conservação de sequência do gene. Neste último plasmídio, o gene de resistência ao cobre apresenta-se ligado a um gene de avirulência, *avrBs1*, responsável pela resposta hipersensível (HR), em cultivares de pimentão que carregam o gene de resistência *Bs1*. Foi identificado também um elemento de transposição, IS476, de 1.225 pb que inativa o gene de avirulência *avrBs1*, permitindo a linhagem antes não patogênica, ser patogênica para pimentão (Kearney & Staskawicz, 1990). A associação do elemento IS476 com o gene Cu<sup>r</sup> em um plasmídio conjugativo, pode estar sendo selecionado pelo emprego contínuo de compostos a base de cobre em culturas de tomate e pimentão, usados justamente para combater fitopatógenos.

Um fragmento *PstI* de 4.5 kb, que contém o gene de resistência do plasmídio pPT23D, foi subclonado e sequenciado (Mellano & Cooksey, 1988). Possui quatro "open reading frames" designados *copA*, *copB*, *copC* e *copD*, todos envolvidos na resistência. Observações preliminares indicaram que o gene de Cu<sup>r</sup> desta linhagem diverge do gene do plasmídio pXV10, já que não houve hibridizações entre eles (Bender et al., 1990). Resultados recentes indicam que os genes de resistência ao cobre das linhagens de *Xanthomonas campestris pv vesicatoria* provenientes da Flórida, Oklahoma e Califórnia, são similares entre si e com o operon *cop* de *P.syringae*. A troca de DNA plasmidal entre essas bactérias pode ser uma explicação possível para a existência dessas similaridades (Voloudakis et al., 1993).

A resistência ao cobre foi relatado também em *Vibrio alginolyticus* (Gordon et al., 1993); *Mycobacterium scrofulaceum* (Erardi et al., 1987); *Saccharomices cerevisiae* (Naiki & Yamagata, 1976) e em algas (Silverberg et al., 1976).

### 2.3.1. Mecanismos de resistência

Íons de cobre são utilizados como elementos traços por diversas linhagens bacterianas. São requeridos para a síntese de metaloproteínas que são, na sua grande maioria, oxigenases e proteínas transportadoras de elétrons (Brown et al., 1992). Ao mesmo tempo que as bactérias utilizam cobre em baixas concentrações, elas precisam desenvolver um mecanismo de regulação bem apurado, pois altos níveis de cobre podem ser tóxicos para as células. O cobre pode formar radicais  $\text{OH}^*$  reativos através de reações redox e estes são altamente reativos, podendo participar de reações deletérias como oxidação de proteínas, rompimento de membranas, peroxidação de lipídios e alterações na estrutura e/ou função de macromoléculas (Brown et al., 1992).

Análises recentes mostraram que organismos que apresentam resistência ao cobre, muitas vezes podem apresentar mecanismos diferentes de resistência (Silver, 1992). Em *E. coli*, um mecanismo de efluxo dependente de energia está associado aos genes de resistência plasmidiais *pcoARBC*. Neste mecanismo de resistência, há a participação de genes presentes no cromossomo das bactérias (genes *Cut*). Em condições normais, o transporte de cobre é feito pelas proteínas codificadas por genes cromossômicos, *CutA* e *CutB* (influxo), seguido da ligação do cobre as proteínas *CutE* e *CutF* e da liberação do cobre pelas proteínas *CutC* e *CutD* (efluxo). Quando o nível de cobre está em excesso, os genes plasmidiais são ativados. Os produtos dos genes plasmidiais *pcoA* e *pcoB* parecem formar um complexo com as proteínas *CutC* e *CutD*, permitindo um rápido efluxo do cobre (Brown et al., 1992).

Por sua vez, em *Pseudomonas syringae*, a resistência está relacionada com ligação periplásmica e sequestro de íons de cobre por proteínas periplásmicas e da membrana externa (Cha & Cooksey, 1991). As células de *Pseudomonas* resistentes ao cobre passaram a ter uma coloração azulada durante o crescimento em meio de cultura em que foi adicionado cobre. A acumulação em células resistentes e induzidas foi

aproximadamente 100X maior do que em células não expostas ao metal (Cha & Cooksey, 1991). O determinante de resistência plasmidial, em *Pseudomonas*, é regulado por um promotor "upstream" ao primeiro gene *copA* e todos os quatro genes são transcritos como unidade única. As localizações dos produtos desses genes foram definidas, estando CopA e CopC, proteínas de 72 e 12 kDa, respectivamente, localizadas no espaço periplásmico e CopB parece estar fortemente ligada a membrana externa. Esta última é uma proteína de 39 kDa. Um octapeptídeo foi determinado (Asp-His-Ser-Gln/Lys-Met-Gln-Gly-Met) e parece estar relacionado com a ligação de íons de cobre.

Em *Vibrio alginolyticus*, o cobre é complexado com material orgânico que se suspeita ser proteína, dando resistência a altos níveis do metal (Gordon et al., 1993). Há evidências de que cápsulas, compostas de polissacarídeos, protegem células bacterianas do efeito tóxico de metais pesados. Este fato já foi observado em *Klebsiella aerogenes* onde as linhagens capsuladas tiveram uma proteção maior contra os efeitos deletérios dos metais cobre e cádmio, do que as linhagens não capsuladas (Bitton & Freihof, 1978).

Algas verdes da espécie *Scenedesmus*, tolerantes ao cobre, acumulam altos níveis de metal em inclusões nucleares. Desta forma, a concentração de cobre no citoplasma permanece baixa, impedindo o contato do metal com organelas citoplasmáticas (Silverberg et al., 1976). Entretanto, nas algas verdes *Chlorella vulgaris*, a exclusão de cobre parece ser o mecanismo de tolerância encontrado (Foster, 1977). Em *Penicillium* foi demonstrado um mecanismo de influxo de cobre dependente de energia, como mecanismo de resistência, sendo que esta resistência é dependente de pH. Protoplastos e micélios apresentam tolerância entre pH 3,0 e 5,5 e sensibilidade, com aumento de influxo de cobre em 10x, em pH 6,0 (Gadd & White, 1985).

No fungo da espécie *Neurospora crassa* foi observado acumulação de cobre paralelamente a síntese de uma proteína de baixo peso molecular, que se liga ao metal.

Esta proteína é classificada, através de análises de estruturas, como membro da superfamília das metalotioneínas e, dependendo da quantidade de cobre presente no meio de cultura, ela pode atuar no mecanismo de detoxificação ou como proteína de estocagem intracelular (Lerch, 1980). Em *Saccharomyces cerevisiae*, há também a produção de proteínas que se ligam ao cobre como forma de diminuir seu efeito tóxico (Naiki & Yamagata, 1976). Mas já foram relatados mecanismos de detoxificação/resistência envolvendo a geração de H<sub>2</sub>S pela célula, que promove o depósito de cobre como sulfeto de cobre na parede celular (Lin et al., 1993).

#### 2.3.1.1. Indução do gene

Os mecanismos de resistência, codificados por genes presentes em diversas bactérias, supostamente devem ser expressos apenas quando o nível do metal esteja alto, o qual poderia provocar danos irreparáveis nas células. Desta forma, através de algum mecanismo sensor, esses genes de resistência são ativados. Isto pôde ser confirmado em trabalhos de diferentes autores.

Rouch et al. (1985), descreveram que a resistência ao cobre de *E.coli* era indutível e que esta resistência era proporcional a concentração de cobre presente no estágio de indução. As células que cresceram desde o pré-inóculo com cobre apresentaram uma fase de adaptação (fase lag) menor do que aquelas que não foram induzidas. Um modelo para a indução dos genes *pco* em *E.coli* foi proposto por Brown et al. (1992), onde uma proteína sensora da concentração de cobre é codificada por genes cromossômicos e está localizada na membrana da célula. Esta proteína, juntamente com uma proteína reguladora, PcoR, são fosforiladas em resposta ao aumento de concentração de cobre no meio. Assim, a proteína reguladora fosforilada, induz os genes de resistência *pco*. Em *Alcaligenes eutrophus*, o plasmídeo pMOL28 responsável pela resistência a cádmio, zinco e cromo, também se mostrou indutível em

experimentos de crescimento celular (Nies & Silver, 1989). O operon de resistência ao cobre, clonado em *P.syringae*, especifica um mRNA induzível a concentrações baixas de cobre (1mM). Este sistema confere resistência somente ao cobre, não sendo induzido por outros cátions como  $Ca^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$  e  $Pb^{+2}$  (Mellano & Cooksey, 1988b). Em *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*, Bender et al. (1990) caracterizaram parcialmente o plasmídeo de resistência ao cobre, pXV10, e demonstraram por mutagênese com o transposon Tn5, o envolvimento de duas regiões do DNA na resistência. Estes mutantes, assim obtidos, têm a resistência ao cobre diminuída ou eliminada. Acredita-se que a resistência seja induzida por considerações da homeostase do cobre. Mas dados comprovando esta suposição ainda não foram publicados. Voloudakis et al. (1993) sugerem que na resistência ao cobre de *Xcv*, esteja envolvido um mecanismo diferente ao de acumulação, pois as células não apresentam a coloração azul quando crescidas em meio com cobre. Estudos com diversas bactérias fitopatogênicas dos gêneros *Agrobacterium*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas* indicaram a indução da resistência ao cobre em linhagens expostas a glutamato, extratos de plantas, tampão fosfato e alguns antibióticos como tetraciclina hidrocloreto e oxitetraciclina hidrocloreto. O glutamato é complexado com o cobre, diminuindo a toxicidade para bactérias. Os antibióticos induziram o aumento da resistência ao cobre, quando adicionados a solução celular em doses subletais. Não foi detectado influências na sensibilidade ao cobre, quando as bactérias foram expostas a uma mistura de solução de cobre mais água destilada filtrada da lavagem de folhas intactas. Entretanto, houve aumento da resistência quando pedaços de folhas foram homogeneizados e misturados com diferentes bactérias (Goto et al., 1993).

### 3.MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1.Linhagens bacterianas

As linhagens bacterianas e plasmídios estão listados nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 - Linhagens bacterianas

Linhagem	Características e/ou hospedeiro	Local de coleta	Fonte ou referência referêcia
<b><i>X. campestris</i></b>			
<i>pv campestris</i> (RefSm)	NRRL-B 1459 Smr		Lanza & Rosato, 1986
<i>pv carotae</i> (366)	<i>Daucus carotae</i>		Takatsu, A. -UnB, 1986
<i>pv cassavae</i> (275)	<i>Manhiot esculenta</i>	Carimagua- Colômbia	Kimura, O.-Colômbia
<i>pv citri</i> (223)	<i>Citrus sinensis</i>	Bataguassú-MS	Neto, J.R. - Inst.Biológico <sup>a</sup>
<i>pv cordiae</i> (505)	<i>Cordia goeldiana</i>		Neto, J.R. - Inst.Biológico
<i>pv glycines</i> (333)	<i>Glycine max</i>		Neto, J.R. - Inst.Biológico
<i>pv malvacearum</i> (559)	<i>Gossypium hirsutum</i>		Neto, J.R. - Inst.Biológico
<i>pv manhiotis</i> (289)	<i>Manhiot esculenta</i>	Brasil	Kimura, O. - ENA 2647
<i>pv melonis</i> (68)	desconhecido		Neto, J.R. - Inst.Biológico
<i>pv passiflorae</i> (444)	desconhecido		Neto, J.R. - Inst.Biológico
<i>pv pelargonii</i> (266)	<i>Geranium pratense</i>		ATCC 11059, 1936
<i>pv phaseoli</i> (558)	<i>Phaseolus vulgaris</i>		Zagatto, A.G., 1986
<i>pv pruni</i> (443)	desconhecido		Neto, J.R. - Inst.Biológico
<i>pv ricini</i> (313)	<i>Ricinis comunis</i>		Neto, J.R. - Inst.Biológico
<i>pv undulosa</i> (578)	<i>Trifolium aestivum</i>		Neto, J.R. - Inst.Biológico
<b><i>pv vesicatoria</i></b>			
310, 332, 401	<i>Capsicum annuum</i>	ND, Mogi das Cruzes, Arealva	Neto, J.R. - Inst.Biológico
317	<i>Nicotiana tabacum</i>	Brasil	Neto, J.R. - Inst.Biológico
408, 420	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Elias Fausto, Sta Bárbara D` Oeste	Neto, J.R. - Inst.Biológico
411, 412, 460	<i>Capsicum annuum</i>	Monte-Mor	Neto, J.R. - Inst.Biológico

Linhagem	Características e/ou hospedeiro	Local de coleta	Fonte ou referência
457, 479, 484	<i>Lycopersicum esculentum</i>	ND, MonteMor, P residentePrudente	Neto, J.R. - Inst. Biológico
462, 466	<i>Capsicum annuum</i>	Flórida, ND	Neto, J.R. - Inst. Biológico
pv <i>viégassie</i> (575)	<i>Pachystachys lutea</i>		Neto, J.R. - Inst. Biológico
<b><i>Pseudomonas gladioli</i></b>			
pv <i>gladioli</i> (604)	desconhecido		Neto, J.R. - Inst. Biológico
<b><i>Escherichia coli</i></b>			
C600	<i>supE44 hsdR thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21</i>		Young & Davis, 1983
DH5 $\alpha$	<i>supE44 DlacU169(f80lacZDM15) hsdR17 recA1 endA1gyrA96 thi-1 relA1</i>		Hanahan, 1983
ED8767	<i>supE44 hsdS20 recA56 galK2 galT22 metB1</i>		Murray et al, 1977
HB101	<i>supE44 hsdS20 recA13 ara-14 xyl-5mtl-1aroA2 lacY1 galK2 rpsL20</i>		Boyer & Roulland
JC1569	<i>F- recA1 gal leu his Strr</i>		Ishihara, 1978
JM101	<i>supE thi (lac-proAB) FtraD36 proAB lac</i>		Messing, 1979
K12/Nal	<i>lac- His- Trp- Pro- Phe- NaF</i>		
W3104	<i>F- gal T12</i>		Ishihara, 1978
W677	<i>F- lac leu thr thi NaI<sup>r</sup></i>		Ishihara, 1978
XA7012	<i>F- Dlac gal e</i>		Ishihara, 1978

a- Instituto Biológico - Campinas, SP.

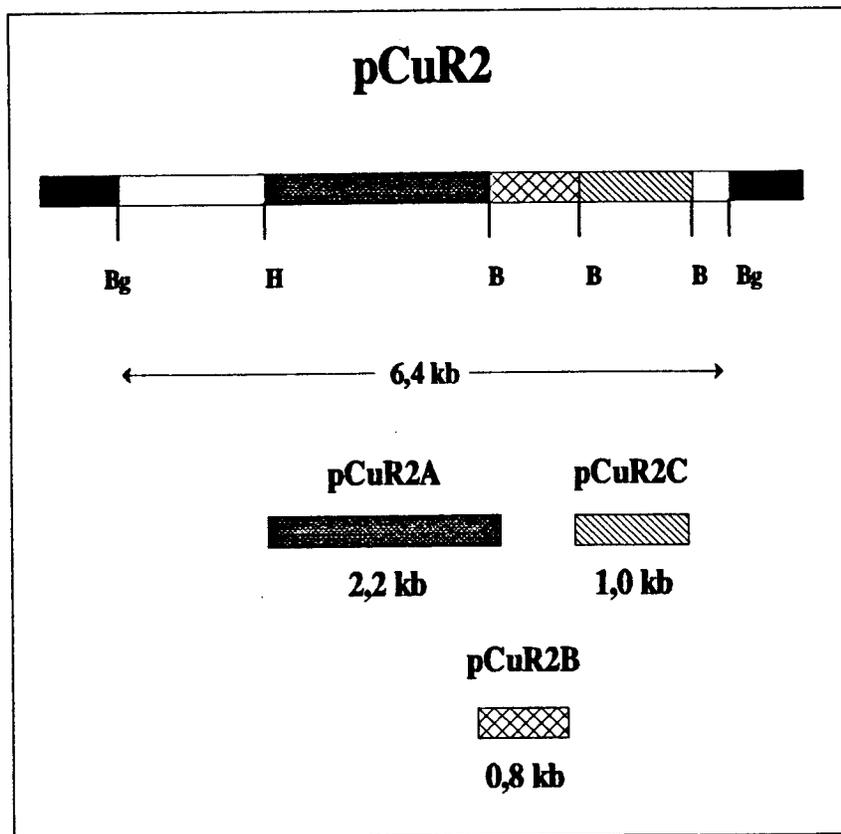
Tabela 2 - Plasmídios

Plasmídios	Linhagem	Características	Fonte ou referência
pRK2073		npt::Tn7, Km <sup>r</sup> , Sp <sup>r</sup> , Tra <sup>+</sup> , "helper"	Leong et al. (1982)
pMFY40		11,6Kb, Tc <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	Fukuda & Yano (1985)
pRCV48	484	Cu <sup>r</sup> , Sm <sup>s</sup>	Este trabalho
pRCV31	310	Cu <sup>r</sup>	Este trabalho
pRCV41	411	Cu <sup>r</sup>	Este trabalho
pRSCu1	RefSm	Cu <sup>r</sup>	Este trabalho
pRSCu2	RefSm	Cu <sup>r</sup>	Este trabalho
pRSCu3	RefSm	Cu <sup>r</sup>	Este trabalho
pCX	DH5 $\alpha$	Cu <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , Ap <sup>s</sup>	Este trabalho

Ap: ampicilina; Sm: estreptomicina; Tc: tetraciclina; Cu: cobre

r: resistente; s: sensível

As sondas utilizadas neste trabalho, que possuem o determinante de resistência ao cobre, são apresentadas na Figura 1. Os três plasmídios pCuR2A, pCuR2B e pCuR2C contêm os fragmentos *HindIII-BamHI* de 2,2Kb, *BamHI* de 0,8Kb e *BamHI* de 1,0Kb, respectivamente, clonados no vetor pUC119, cuja marca de seleção é o gene de resistência a ampicilina.



**Figura 1:** Localização dos fragmentos internos do plasmídeo pCuR2, utilizados como sondas específicas para genes de Cu<sup>r</sup>. Figura reproduzida parcialmente, do trabalho publicado por Garde & Bender (1991). Bg: *BglIII*; H: *HindIII* e B: *BamHI*.

### 3.2. Meios de cultura

Todos os meios de cultura foram esterelizados por autoclavagem a 121 atm por 20 minutos e estocados a temperatura ambiente, quando não utilizados imediatamente.

#### 3.2.1.-Meio Nutriente Agar (NA):

Extrato de carne.....	3,0g	
Peptona. ....	5,0g	
Ágar.....	15,0g	
H <sub>2</sub> O q.s.p.....	1000ml	pH 6,8 - 7,2

O meio NA líquido consiste do meio NA sólido, sem a adição de ágar.

#### 3.2.2.-Meio NYGA (meio sólido completo):

Extrato de levedura.....	3,0g	
Peptona ....	5,0g	
Glicerol.....	20,0g	
Ágar.....	15,0g	
H <sub>2</sub> O q.s.p.....	1000ml	pH 7,0

#### 3.2.3.-Meio NYGB (meio líquido completo):

Este meio consiste do meio NYGA sem adição de ágar.

#### 3.2.4.- Meio Luria Bertani (LB):

Bacto - tryptona.....	10,0g	
Extrato de levedura.....	5,0g	
Cloreto de sódio.....	5,0g	
H <sub>2</sub> O q.s.p.....	1000ml	pH 7,0

### 3.2.5.- Meio YM:

Extrato de malte.....	3,0g	
Extrato de levedura.....	3,0g	
Peptona.....	5,0g	
Glicose.....	10,0g	
H <sub>2</sub> O q. s. p.....	1000 ml	pH 7,0

### 3.3. Determinação do nível de resistência ao cobre

Diferentes linhagens de *Xcv* foram crescidas em meio NA líquido durante 16 horas a 28° C, com agitação. A densidade celular foi ajustada em solução salina 0,9%, para absorbância (Abs) 0,1 a 600 nm através do espectrofotômetro (DU-65 Beckmann) e 10 µl de cada solução foram aplicadas, em duplicata, em placas de meio NA com diferentes concentrações de sulfato de cobre (0 a 400 µg/ml). As placas foram mantidas em estufa a 28°C por 72 horas. A concentração que inibiu o crescimento conflente após este período, foi considerada como concentração mínima inibitória (CMI).

A mesma metodologia foi empregada para *E.coli* sendo que, o meio inicialmente utilizado para os testes foi LB, e as placas foram mantidas em estufa a 37°C por 72 horas. Os meios de cultura posteriormente, foram padronizados para NA.

### 3.4. Extração de DNA total

As extrações de DNA das 22 linhagens de *Xanthomonas campestris*, de 2 linhagens de *E. coli* (W3104 e XA7012) e de uma linhagem de *Pseudomonas gladioli* pv *gladioli* (604), foram feitas através de metodologia descrita por Goss et al (1990), com modificações.

Culturas bacterianas crescidas durante 16 - 18 horas em meio NA ou NYGB foram centrifugadas e ressuspendidas em tampão TAS ( 50mM Tris-HCl, pH 8,0; 50mM EDTA; 150 mM NaCl ), acrescidos de 1% de SDS e 150  $\mu$ g/ml de proteinase K. A solução foi incubada por 1 hora a 50°C, e, posteriormente, o DNA foi extraído duas vezes com fenol:clorofórmio (1:1) e uma vez com clorofórmio (2V). A seguir, o material foi dialisado em TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) por 48 horas, concentrado com polietilenoglicol (PEG - Sigma) e armazenado a 4°C.

### **3.5. Extração de DNA plasmidial**

As extrações de DNA plasmidial foram feitas através do método de lise alcalina segundo Birboim & Doly (1979), com modificações descritas por Maniatis et al (1982).

### **3.6. Purificação em Cloreto de Césio**

O DNA plasmidial do vetor pMFY40 (tabela 2), foi purificado através de gradiente de cloreto de césio. A extração de DNA foi feita como descrito no item 3.5, sendo que em larga escala, a partir de um cultivo em 500 ml de meio de LB.

Após a lavagem do sedimento com etanol 70%, este foi seco e ressuspendido em 4,0 ml de TE. Adicionaram-se 4,4g de CsCl e 0,4 ml de brometo de etídio (10 mg/ml). A solução foi deixada no escuro por 1 hora. A seguir, a solução foi centrifugada a 8000 rpm/5min a temperatura ambiente, em rotor Beckman JA-20 e, o sobrenadante, transferido para tubo Falcon. A densidade final da solução foi ajustada para 1,55 g/ml, através de um refratômetro, para um índice de refração de 1,3860. Após esta etapa, o material foi transferido para tubos de ultracentrífuga, próprios para rotor Beckman VTi-80. O material foi centrifugado a 60000 rpm por 20 horas e a

banda correspondente ao DNA plasmidial foi retirada com auxílio de uma seringa e transferida para um Eppendorf. O brometo de etídio foi retirado da amostra através de sucessivas centrifugações com butanol saturado com H<sub>2</sub>O. O material foi dialisado contra TE por 48h para retirar o CsCl presente. A seguir, adicionou-se 0,1V de acetato de sódio 3M e 2V de etanol absoluto e o material foi incubado por 2h a -20°C, sendo depois recuperado por centrifugação a 12000 rpm/20min, lavado com etanol 70% e ressuspensionado em TE.

### 3.7. Conjugação

Experimentos de conjugação foram feitos entre a linhagem 484, resistente ao cobre, e a linhagem RefSm, sensível ao cobre, resistente ao antibiótico estreptomicina e não portadora de plasmídios. As conjugações foram feitas com ou sem o auxílio do plasmídio mobilizador pRK2073 (Tabela 2).

A partir de 1,0 ml da cultura da linhagem doadora (Cu<sup>r</sup>Sm<sup>r</sup>), crescida durante 16 horas, foi feita uma centrifugação das células a 12000 rpm/3min e o sobrenadante obtido foi descartado. A seguir, foi centrifugado 1,0 ml das células receptoras (Cu<sup>s</sup>Sm<sup>r</sup>) no mesmo tubo Eppendorf anterior. O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento obtido foi ressuspensionado na solução restante no tubo Eppendorf. O material foi plaqueado em placas de meio NA sem qualquer agente seletivo.

Para cruzamentos tri-parentais (Ditta et al., 1980), o procedimento foi semelhante, com a exceção de que 1,0 ml da cultura do plasmídio mobilizador foi centrifugada entre as etapas de centrifugação das células doadoras e receptoras.

As placas foram mantidas a 28°C durante 24 horas e, a seguir, a massa celular crescida foi diluída em solução salina (0,9%) e plaqueada em meios de seleção contendo cobre (200 µg/ml) e estreptomicina (100 µg/ml).

### **3.8. Digestão com enzimas de restrição:**

Todas as enzimas utilizadas neste trabalho foram obtidas das firmas Bethesda Research Laboratory (BRL), New England Biolabs, Pharmacia e Sigma.

Os tampões e condições de digestão (temperatura e concentração de sal) foram utilizados conforme as instruções dos fabricantes.

### **3.9. Experimentos de hibridização**

#### **3.9.1. Transferência alcalina**

A metodologia de transferência alcalina dos fragmentos de DNA para membranas de náilon foi praticamente a mesma descrita por Maniatis et al (1982).

O DNA cromossômico e/ou plasmidial digerido com endonuclease de restrição apropriada, foi separado em gel de agarose 0,8% através de eletroforese em tampão Tris Acetato (TAE-tris-acetato 0,04 mM; EDTA 0,001 mM). O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml) e fotografado.

A incubação do gel em 250 ml de solução de despurinação (HCl 0,25 N), ocorreu por 15 min. à temperatura ambiente com suave agitação. O gel foi lavado com água destilada esterelizada e incubado por mais 30 min em 250 ml de solução de desnaturação (NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M). A seguir foi montado o sistema de transferência que consistiu de: papel Whatmann 3MM, gel, filtro de náilon Hybond N (Amersham), 2 folhas de papel Whatmann, papel absorvente, placa de vidro e peso de 0,5 a 1,0 kg. A transferência, feita em tampão de transferência alcalina (NaOH 0,25 M; NaCl 1,5 M), ocorreu por um período de 16 a 18 horas. Alternativamente, foi feita uma transferência rápida (aproximadamente 3 horas) dos fragmentos de restrição onde, após a incubação do gel na solução de desnaturação, este foi neutralizado durante 30

min em tampão de neutralização (NaOH 20 mM; acetato de amônio 1 M). A seguir, o sistema de transferência foi montado: gel, filtro de nylon Hybond N (Amersham) embebido em solução de neutralização, 3 folhas de papel Whatmann, 3 a 4 cm de papel absorvente, placa de vidro e peso de aproximadamente 0,5 a 1 Kg.

Após este período, o filtro foi lavado com 100 ml de SSC 2X por 2 min secado à temperatura ambiente e incubado a 80°C por 10 min para fixação do DNA, estando assim pronto para hibridizar.

### 3.9.2. Marcação das sondas de DNA

Os fragmentos utilizados como sondas foram purificados do gel utilizando-se papel DEAE (Whatmann DE81), o qual foi introduzido no gel, abaixo dos fragmentos desejados. Quando os fragmentos de interesse migraram para o papel durante eletroforese, estes foram eluídos em tampão de eluição (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0; EDTA 2,0 mM; NaCl 1,5 mM) por 1h/45°C. A seguir, os DNAs em solução foram transferidos para outro eppendorf e, posteriormente, foram precipitados com etanol por 1h/-70°C, recuperados através de 20 min de centrifugação a 12000 rpm, lavados com etanol 70% e ressuspensos em volume apropriado de TE. Alternativamente, os fragmentos de interesse foram isolados através do "GeneClean Kit" (Bio 101, Inc., La Jolla, Calif.), como determinado pelo fabricante.

A sonda foi marcada com digoxigenina de acordo com instruções do fabricante (Non radioactive labelling Kit, Boehringer-Mannheim). Foram utilizados cerca de 200 ng de DNA. Os fragmentos *HindIII-BamHI* de 2,2 Kb, *BamHI* de 0,8 Kb e *BamHI* de 1,0 Kb marcados, passaram a ser chamados de 2A.1, 2B.1 e 2C.1, respectivamente.

### 3.9.3. Hibridização

O filtro de nylon foi pré-hibridizado com 30 ml de solução de hibridização (SSC 5X; solução bloqueadora 10%, N-lauroilsarcosina 1,0%; SDS 0,02%) a 42°C por 3 a 4 horas sob suave agitação. Em seguida, foi hibridizado com 20 ml de solução de hibridização contendo a sonda marcada, durante a noite, na mesma temperatura descrita, na presença de 50 % de formamida. Posteriormente, o filtro foi lavado exaustivamente em 200 ml de SSC 2X; SDS 0,1% a temperatura ambiente e em 200 ml de SSC 0,5X; SDS 0,1% a 68°C. Todas as lavagens foram feitas duas vezes por 20 min cada.

### 3.9.4. Detecção da hibridização

O DNA marcado com Digoxigenina (DIG) foi detectado através de uma reação antígeno-anticorpo. Utilizou-se antidigoxigenina conjugada com a enzima fosfatase alcalina, cuja ação enzimática sobre o substrato Lumigem PPD (Boehringer-Mannheim), produz luminescência, a qual pode ser detectada em filmes de raio X.

Após as lavagens descritas no item 3.11, o filtro foi lavado por 5 min em Tampão I (ácido maléico 0,1 M; NaCl 0,15 M; pH 7,5) e incubados por 30 min em Tampão II (tampão I contendo reagente bloqueador 1%). O conjugado anti-DIG -AP foi diluído para 75 mU/ml em Tampão II e o filtro foi incubado por 30 min em 20 ml dessa solução. A seguir, foram feitas duas lavagens, de 15 min cada, em 100 ml de Tampão de lavagem (tampão I contendo Tween 20, 0,3%) e o filtro foi equilibrado por 3 min em 20 ml de Tampão III ( Tris-HCl 0,1 M; NaCl 0,1 M; MgCl<sub>2</sub> 50 mM; pH 9,5). O filtro foi incubado por 5 min em 10 ml de solução de AMPPD diluída (0,1 mg/ml), selado em plástico e mantido na estufa a 37°C por 10 min. A seguir, foi exposto a filmes de raio X (Fuji) por períodos que variavam de 30 minutos a 2 horas,

para detecção da luminescência. Os filmes foram revelados por 3 min e fixados por 2 min com solução reveladora e fixadora (Kodak), respectivamente.

### 3.10. Perfil plasmidial das linhagens resistentes ao cobre

As linhagens 310, 411 e 484, de *Xcv*, que apresentaram resistência ao cobre pelo teste descrito no ítem 3.3, foram analisadas quanto ao perfil plasmidial quando digeridos com as enzimas *EcoRI*, *HindIII*, *PstI* e *XhoI*.

### 3.11. Clonagem

#### 3.11.1. Ligaçãõ DNA-vetor

Inicialmente, para a clonagem molecular, o plasmídeo da linhagem 484, foi digerido com *PstI* e hibridizado com as sondas 2A.1, 2A.2 e 2A.3, descritas anteriormente. Dois fragmentos hibridizaram com as três sondas: um de aproximadamente 3,1 Kb e outro de 1,3 Kb. O fragmento de 3,1 Kb que hibridizou, foi purificado do gel através do "Gene Clean Kit", segundo instruções do fabricante, ligado ao vetor pMFY40 de 11,4 Kb (Tabela 2), previamente defosforilado com a enzima *CIP* (10000 U/ml). Este vetor apresenta resistência à ampicilina (Ap) e tetraciclina (Tc), e possui um sítio de restrição único da enzima *PstI*, localizado dentro do gene de resistência à ampicilina. O DNA do vetor foi obtido conforme descrito nos ítems 3.5 e 3.6, e o plasmídeo passou a ser chamado de pCX. Paralelamente, tentou-se a clonagem do fragmento de 1,3 kb no mesmo vetor pMFY40 e no vetor pBluescript KS. Mas os resultados foram infrutíferos, não tendo sido obtidos clones positivos.

A reação de ligação foi efetuada com a enzima *T4 DNA ligase* (BRL), em um sistema de 20  $\mu$ l, contendo 100 ng de inserto e 100 ng de vetor, segundo instruções do fabricante.

### 3.11.2. Transformação e seleção dos transformantes

Após a ligação, o material foi transformado na linhagem DH5 $\alpha$  (Tabela 1), segundo Maniatis et al., 1982. As células transformadas foram selecionadas em placas contendo tetraciclina, após crescimento a 37°C por 18 horas. As colônias crescidas foram selecionadas e plaqueadas em meio LB/Tc, com réplica em meio LB/Ap e meio LB/Tc/Cobre. Duas concentrações de cobre foram utilizadas, 100 e 200  $\mu\text{g/ml}$ . Desta forma, pode-se selecionar as colônias que contêm o inserto por inativação do gene de resistência a Ap e também pela expressão em meio com cobre. Estas placas foram mantidas a 37°C por 24 h. Posteriormente, das colônias que cresceram em meio LB/Tc/Cu, foram feitas extrações de DNA (mini-prep), digestões com a enzima *PstI* e hibridização com a sonda 2A.1.

### 3.12. Eletrotransformação

Entre as linhagens sensíveis, foi escolhida arbitrariamente a linhagem 457, para a realização dos experimentos de eletrotransformação com o plasmídeo pCX (Tabela 2).

A transformação foi efetuada através do eletroporador "Gene Pulser" (BioRad). As células competentes foram preparadas segundo White & Gonzales (1991). Elas foram crescidas em 100 ml de meio YM, a 28°C até a Abs de 0,5 - 0,65 a 640 nm. A seguir as células foram centrifugadas a 4000rpm/15min e o precipitado lavado com 50 ml de água gelada esterilizada, seguido de nova lavagem com 25 ml de água. Duas sucessivas centrifugações foram feitas a 4000 rpm/15min, após ressuspensão do precipitado em 20 ml e 10 ml de glicerol 10% gelado. Ao final, o precipitado foi ressuspendido em 1,0 ml de glicerol 10% gelado e mantido no gelo. A mistura de eletroporação consistiu de 0,1  $\mu\text{g}$  de DNA plasmidial e 40  $\mu\text{l}$  de células competentes.

Após o pulso, as células assim obtidas, foram incubadas em meio YM por 1 hora a 28 °C e, a seguir, semeadas em meio NA contendo tetraciclina. Após crescimento a 28°C, as colônias foram repicadas em meio contendo 50, 100 e 200 µg/ml de cobre e mantidas a a 28°C por 48 horas.

Foram feitas extrações de DNA plasmidial e total dos transformantes, que cresceram em meio de cultura NA com adição de cobre. O DNA obtido, foi digerido com a enzima *PstI* e utilizado para hibridização com o fragmento marcado de 3,1 kb do pCX.

### **3.13. Mecanismo de resistência**

A determinação do conteúdo de cobre acumulado nas bactérias, através de digestão ácida da matéria orgânica, foi feita de acordo com metodologia descrita por Ganje & Page (1974) e Nkong & Ballance (1982). Após a digestão ácida das bactérias, o material obtido foi medido no espectrofotômetro de absorção atômica.

#### **3.13.1. Digestão ácida das bactérias**

O crescimento celular da linhagem resistente 484, foi feito em dois Erlenmeyers com 500 ml de meio NA, durante à noite a 28°C, com agitação, a partir de pré-inóculo. Em uma das amostras, foi adicionado cobre para uma concentração de 200 µg/ml, enquanto a segunda amostra permaneceu crescendo em meio de cultura sem adição de cobre. Esta concentração foi escolhida, por haver apenas crescimento das linhagens resistentes. Após esta fase, as densidades celulares foram ajustadas para 0,6 a Abs 600 nm e, no meio de cultura onde estava crescendo a linhagem 484 sem cobre, foi adicionado  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  para a mesma concentração da linhagem 484, a qual já estava crescendo com o metal. Isto foi feito para não interferir nas medições feitas pelo

espectrofotômetro de absorção atômica, podendo-se supor que a medida obtida era do cobre presente em solução. As células foram centrifugadas a 7000 rpm/15 min e o sedimento foi ressuspenso em 10 ml de água Milli-Q esterelizada. De cada linhagem, transferiram-se 1,3 ml para tubos de ensaio para digestão e adicionaram-se 2,0 ml de  $H_2SO_4$  concentrado. O controle da digestão utilizado foi solução de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , sem a presença de bactérias.

Os tubos de ensaio foram transferidos para bloco digestor onde ocorreu a digestão da matéria orgânica, até o clareamento das amostras (cerca de 24 horas). Foram adicionados 100  $\mu$ l de  $H_2O_2$  30% aos tubos de digestão frios para completar a oxidação e, em seguida, os tubos foram novamente colocados no bloco digestor por 30 minutos para total evaporação da  $H_2O_2$ . O volume final das amostras foi completado para 100 ml com água Milli-Q esterelizada. Todo o experimento foi feito em duplicata.

### **3.13.2. Leitura no espectrofotômetro de absorção atômica**

A espectroscopia de absorção atômica vem sendo utilizada para a determinação direta de um grande número de metais em solução. Tem sido usada para detectar quantidades traços de metais em sistemas orgânicos, inorgânicos e biológicos.

Inicialmente, uma curva padrão foi elaborada a partir de uma solução estoque de 1000 ppm (mg/l) de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , obtendo-se soluções da concentração de 1 ppm até 11 ppm. O espectrofotômetro de absorção atômica FMD3-Zeiss foi ajustado para a leitura de cobre a Abs de 324,8 e equilibrado através da curva padrão. Imediatamente a seguir, as amostras foram lidas no aparelho para medir quanto de cobre foi absorvido.

### **3.13.3. Preparação de bactérias para microscopia eletrônica de transmissão**

A linhagem 484 foi crescida, durante a noite, em dois Erlenmeyers de 125 ml

cada com 50 ml de meio NA, sendo apenas um deles acrescido de 200  $\mu\text{g/ml}$  de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . As células foram centrifugadas a 4000 rpm/15 min/4°C e o sobrenadante desprezado. O material foi ressuspensionado em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4 (Tampão I) e centrifugado a 4000 rpm/15 min/4°C. O sedimento foi ressuspensionado em glutaraldeído 2,0% em Tampão I e pré-fixado durante 1h/4°C. As células foram centrifugadas novamente a 4000 rpm/15 min/4°C e ressuspensionadas novamente em Tampão I. Este procedimento foi repetido mais duas vezes. Na última centrifugação, o sedimento foi fixado em  $\text{OsO}_4$  1,0% em Tampão I, durante 10 min/4°C. O material foi centrifugado novamente a 4000 rpm/15 min/4°C e o sobrenadante desprezado. O sedimento foi lavado rapidamente em água destilada por centrifugação e a massa celular obtida foi incluída em ágar-água 1,5%. Seguiram-se sucessivas desidratações, por 10 min, em cada uma das seguintes concentrações de acetona: 30%, 50%, 70%, 90% e 100%. A desidratação a 100% foi repetida mais uma vez. e, o material já desidratado, foi infiltrado em acetona:resina na proporção 1:1, a temperatura ambiente em rotor, por 24 horas. A seguir, foi feita nova infiltração com resina pura por 24 horas a temperatura ambiente, em rotor, tendo a polimerização ocorrido a 70°C durante 3-5 dias. Em seguida, o material foi incluído em resina Epon-araldite durante 3 dias em estufa a 70°C, sendo feitos posteriormente, cortes semi-finos (0,5-1,0 mm) nos blocos obtidos para observação ao microscópio óptico. Após a constatação da eficiência da metodologia, cortes ultrafinos (60 nm) foram obtidos e o material foi colocado em "grids" com diâmetro de 200 "meschs" para análise no Microscópio Eletrônico de Transmissão, modelo CEM 902 - Zeiss, pertencente ao Instituto de Química da Unicamp.

A técnica utilizada para esta análise, Espectroscopia de Imagem de Elétrons, utiliza diferenças de energias de elétrons para obtenção da localização do metal na imagem produzida (Kunz, M. et al., 1989). As análises foram feitas a 910 eV (baixa energia) e 931 eV (alta energia). O programa de computador IBAS (Nunes,S.

comunicação pessoal), foi utilizado para localização do metal presente na amostra crescida com cobre.

### **3.13.4. Extração de proteínas totais para eletroforese em SDS-PAGE**

#### **3.13.4.1. Extração, aplicação das amostras e eletroforese**

A técnica de extração de proteínas totais de *Xcv*, baseou-se na metodologia descrita por Vauterin et al. (1991). As extrações foram feitas com as linhagens 484 e 457 (Tabela 1).

As células, crescidas em 3,0 ml de meio NA líquido, com concentrações crescentes de cobre (0 a 250  $\mu\text{g/ml}$ ), foram centrifugadas a 12000 rpm/3 min. O sedimento foi ressuscitado em 400  $\mu\text{l}$  de tampão Salina-Fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,03 M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,016M,  $\text{NaCl}$  0,137 M) e centrifugado a 10000 rpm/10 min. Esta etapa foi repetida mais uma vez, e, a seguir, o sedimento foi ressuscitado em tampão de ressuspensão ( $\beta$ -mercaptoetanol 5%, Tris 0,06M, glicerol 10% e 140  $\mu\text{l}$  de SDS 20%) e mantido a 95°C/10 min. Para cada 70 mg de "pellet", utilizou-se 1,0 ml de tampão de ressuspensão. Após centrifugação a 10000 rpm/10 min, o sobrenadante foi transferido para outro eppendorf e estocado a - 20°C até o momento de uso.

A metodologia utilizada na preparação do gel de poliacrilamida foi a descrita por Laemmli (1970), sendo que as concentrações do gel de separação e de resolução foram, respectivamente, 10 e 4%.

O tampão de corrida consistiu de Tris-HCl 25 mM; glicina 0,192 mM pH 8,3; SDS 0,1%. Após a aplicação das amostras no gel, a corrida de eletroforese foi feita a temperatura ambiente a 100 V, até que a frente de azul de bromofenol atingisse o final do gel de separação. Os marcadores de peso molecular foram obtidos da Promega e consistiram de: Fosforilase B (97400 Da); Soro albumina bovina-BSA (66200 Da); Glutamato desidrogenase (55000 Da); Ovalbumina (42700 Da); Aldolase

(40000 Da); Anidrase carbônica (31000); Inibidor de tripsina de soja (21500 Da) e Lisozima (14400 Da).

### 3.13.4.2. Coloração do gel de poliacrilamida com prata

A coloração de proteínas seguiu a metodologia descrita por Blum et al. (1987), com modificações. A sequência de coloração está descrita na tabela abaixo.

Tabela 3 - Coloração de proteínas com prata

Soluções	tempo de tratamento
Fixador (etanol 50%; ácido acético 12%; formaldeído 37%)	> 1h
Etanol 50%	3X 20 min
Solução de pré-tratamento (Tiosulfato de sódio 0,02%)	1 min
Água destilada	3X 20 seg
Solução de impregnação (AgNO <sub>3</sub> 0,2%, 0,75 ml/l de formaldeído 37%)	20 min
Água destilada	2X 20 seg
Solução reveladora (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 6%; tiosulfato de sódio 0,4 mg%; 0,5 ml/l de formaldeído 37%)	até 10 min
Água destilada	2X 2min
Solução de bloqueio (etanol 50%; ácido acético 12%)	10 min
Etanol 50%	> 20 min

O gel, após ser fotografado, foi plastificado com papel celofane e secado à temperatura ambiente.

### 3.13.5. Indução do gene de resistência ao cobre

Foram feitos três pré-inóculos, em meio NA líquido, com a linhagem 484, sendo apenas um suplementado com 50  $\mu\text{g/ml}$  de cobre. Após crescimento durante 16 - 18 horas, inoculou-se 1,0 ml de cada pré-inóculo em três Erlenmeyers de 125 ml contendo 20 ml de meio NA líquido. Dois desses Erlenmeyers, sendo um deles obrigatoriamente o que já possuía cobre no pré-inóculo, foram suplementados com cobre para a concentração de 250  $\mu\text{g/ml}$ . Os controles consistiam da linhagem 484 crescida em meio NA líquido sem adição de cobre em nenhuma das fases de crescimento, e da linhagem 457, sensível ao cobre, cujo pré-inóculo foi feito apenas em meio NA líquido e no inóculo foi adicionado cobre para 250  $\mu\text{g/ml}$ .

Após 30 min de crescimento a 28°C, com agitação, mediu-se a absorbância em espectrofotômetro de 30 em 30 min durante 2 horas e meia e, a seguir, as amostras foram retiradas em intervalos de 2 horas. As amostras consistiam de: (A) linhagem 484 crescida em pré-inóculo com 50  $\mu\text{g/ml}$  de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e cujo inóculo possuía 250  $\mu\text{g/ml}$ ; (B) linhagem 484 crescida em pré inóculo sem adição de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e cujo inóculo possuía 250  $\mu\text{g/ml}$ , (C) linhagem 484 crescida apenas em meio NA, sem adição de cobre, em nenhuma etapa do experimento e (D) linhagem 457 crescida em meio NA sem adição de cobre no pré-inóculo e cujo inóculo possuía 250  $\mu\text{g/ml}$  do metal.

Paralelamente às medidas de absorbância, foi medido o pH das amostras, através de papel indicador, e comparados a uma tabela padrão de cores.

## 4.RESULTADOS

### 4.1.Determinação do nível de resistência ao cobre

Os níveis de resistência das linhagens de *Xanthomonas sp* e de *E.coli* estão descritos na Tabela 5. Considerou-se como linhagens sensíveis, de baixa resistência e de alta resistência ao cobre, as linhagens que apresentaram crescimento, respectivamente, em 50-140, 150-240 e 250-400  $\mu\text{g/ml}$  de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Esta classificação baseou-se no trabalho descrito por Sundin et al. (1976) e Bender & Cooksey (1986).

Tabela 4 - Nível de resistência ao cobre

Linhagens	Concentração de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )								
	0	50	100	150	200	250	300	350	400
<i>Xanthomonas</i>									
68	++	++	-	-	-	-	-	-	-
223	++	++	-	-	-	-	-	-	-
266	++	-	-	-	-	-	-	-	-
275	++	++	+	-	-	-	-	-	-
289	++	-	-	-	-	-	-	-	-
310	++	++	++	++	-	-	-	-	-
313	++	-	-	-	-	-	-	-	-
317	++	++	-	-	-	-	-	-	-
332	++	+	-	-	-	-	-	-	-

Linhasgens	Concentração de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )								
	0	50	100	150	200	250	300	350	400
366	++	-	-	-	-	-	-	-	-
401	++	++	++	++	++	++	++	-	-
408	++	++	+	+	-	-	-	-	-
411	++	++	++	++	++	++	+	-	-
412	++	++	-	-	-	-	-	-	-
420	++	++	++	+	+	-	-	-	-
443	++	++	-	-	-	-	-	-	-
444	++	+	+	+	-	-	-	-	-
457	++	++	-	-	-	-	-	-	-
460	++	-	-	-	-	-	-	-	-
462	++	++	++	++	++	++	++	-	-
466	++	++	++	-	-	-	-	-	-
479	++	++	-	-	-	-	-	-	-
484	++	++	++	++	++	++	++	-	-
505	++	++	-	-	-	-	-	-	-
558	++	-	-	-	-	-	-	-	-
559	++	++	-	-	-	-	-	-	-
576	++	++	-	-	-	-	-	-	-
578	++	++	-	-	-	-	-	-	-
RefSm	++	++	+	-	-	-	-	-	-

Linhagens	Concentração de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )									
	0	50	100	150	200	250	300	350	400	
<i>E.coli</i>										
C600	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
DH5 $\alpha$	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
ED8767	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
HB101	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
JC1569	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
JM101	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
K12/Nal	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
W3104	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
W677	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
XA7012	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-

++ crescimento confluyente

+ crescimento de colônias isoladas

- ausência de crescimento

Das 14 linhagens de *Xcv* testadas, 4 (28,6%) apresentaram alta resistência (linhagens 401, 411, 462 e 484), 2 (14,3%) apresentaram baixa resistência (linhagens 310, e 420) e o restante (57,1%) se mostrou sensível ao cobre (linhagens 317, 332, 408, 412, 457, 460, 466 e 479). Em relação aos outros 15 patovares testados, todos foram considerados sensíveis ao cobre, sendo apenas determinado exatamente a CMI (Concentração Mínima Inibitória) de 50  $\mu\text{g/ml}$  e 100  $\mu\text{g/ml}$  dos pv *passiflorae* (444) e *cassavae* (275), respectivamente. Todas as linhagens de *E.coli* foram consideradas sensíveis ao cobre.

## 4.2. Conjugação

Três transconjugantes, RSCu1, RSCu2 e RSCu3 foram obtidos através de conjugações entre as linhagens 484 e RefSm, sem o auxílio do plasmídeo mobilizador pRK2073. Foi observada a presença do plasmídeo nativo da 484 (pRCV48) no transconjugante RefSmCu1, através de extrações de DNA e hibridizações com a sonda 2A.1. Os DNAs foram digeridos com a enzima *EcoRI* (Figura 2). Os outros dois transconjugantes também foram analisados, sendo obtidos resultados similares. As outras sondas também foram testadas e o mesmo resultado foi obtido (dados não mostrados).

O nível de resistência ao cobre foi determinado sendo observado um aumento na resistência dos transconjugantes. A linhagem RefSm cresceu até uma CMI de 100  $\mu\text{g/ml}$ , enquanto os transconjugantes tiveram uma CMI entre 300 e 350  $\mu\text{g/ml}$ , confirmando a presença e expressão do gene de  $\text{Cu}^r$ .

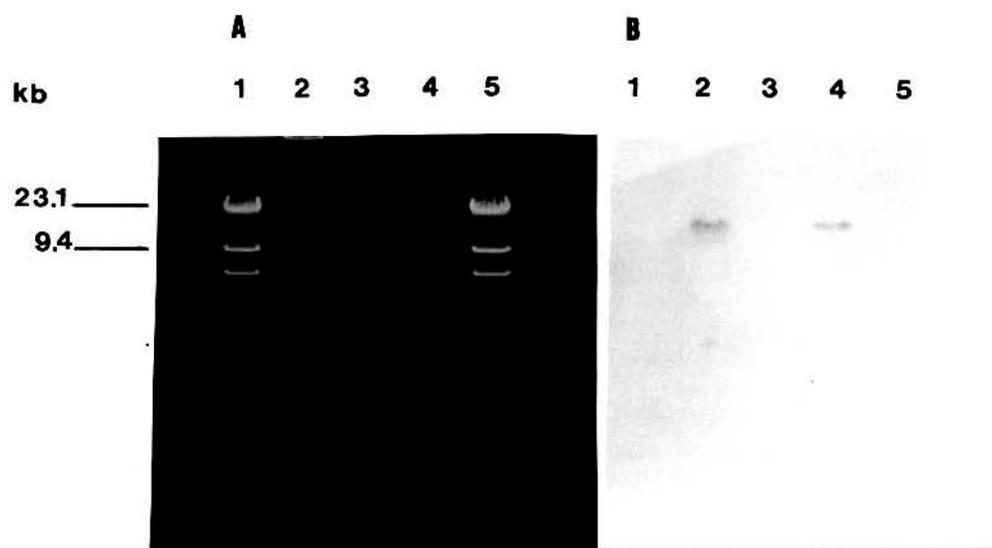
## 4.3. Detecção do gene de resistência

Foram extraídos DNA genômico e plasmidial das linhagens sensíveis (408, 457 e 479) e resistentes (310, 411 e 484), selecionadas a partir dos resultados do teste de resistência descrito no item 4.1. Os DNAs foram digeridos com *EcoRI* e hibridizados com as sondas descritas no item 3.8.

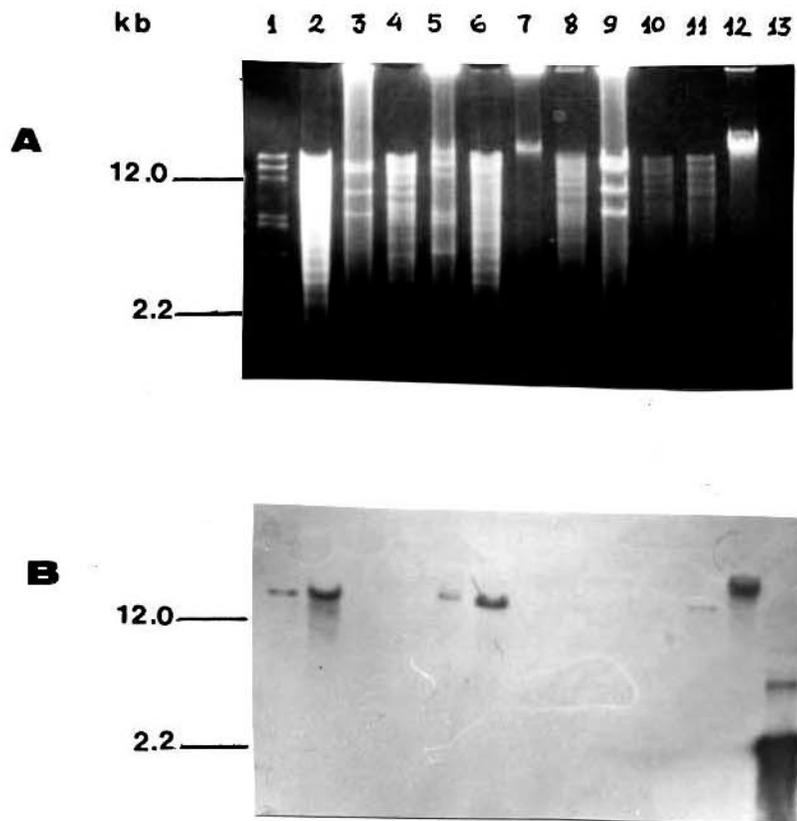
Foram detectadas hibridizações tanto nos plasmídios quanto nos cromossomos das linhagens resistentes do pv *vesicatoria* (Figura 3). As hibridizações ocorreram em um fragmento de cerca de 15.4 Kb no plasmídeo e cromossomo da linhagem 310 e em um fragmento um pouco maior que 15.0 Kb na linhagem 411. Na 484, a hibridização se deu no fragmento de 15 Kb, presente no DNA cromossômico. A estimativa do tamanho dos fragmentos foi feita através do programa ELETRO (Leite, A.,

comunicação pessoal).

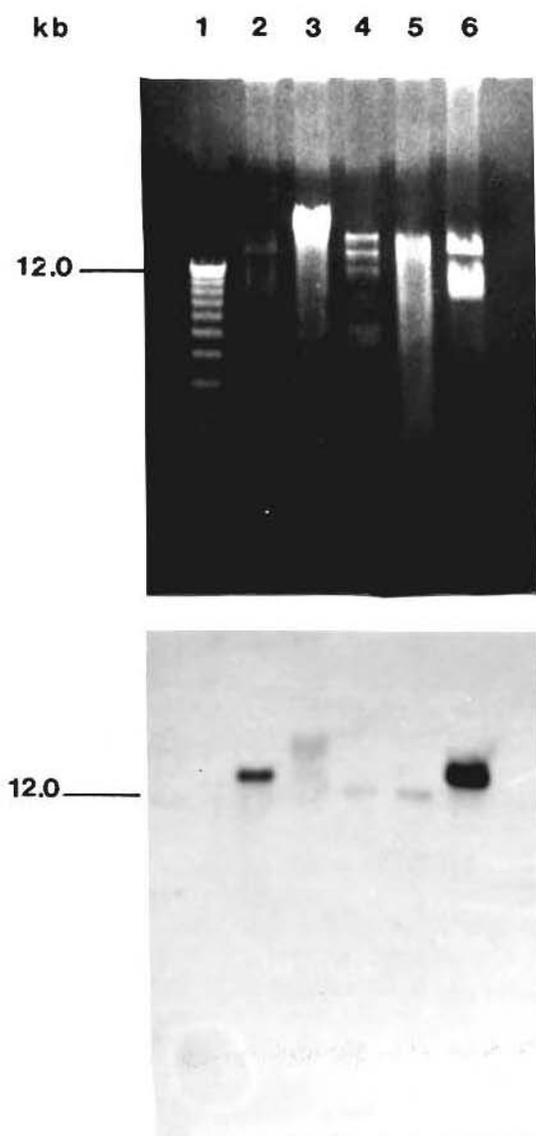
Do DNA total, extraído e digerido com *EcoRI*, dos pv *citri* (223), *cassavae* (275), *pelargoni* (266), *manhiotis* (289), *ricine* (313), *glycines* (333), *carotae* (366), *phaseoli* (558), *passiflorae* (444), *pruni* (443), *melonis* (68), *ricini* (313), *campestris* (RefSm), *cordiae* (505), *viegassie* (575), *undulosa* (578), e *malvacearum* (559) do gênero *Xanthomonas*, somente houve hibridização com a sonda no cromossomo dos pv *melonis* (68) e *cassavae* (275). A partir desse resultado, foram feitos novos mini-preps de plasmídios e de cromossomos dessas duas linhagens e uma nova hibridização com a sonda 2A.1. Pode-se constatar hibridização no plasmídio e cromossomo de ambas as linhagens (Figura 4) em fragmentos de aproximadamente 15,0 e 10,9 kb, pertencentes, respectivamente ao patovar *melonis* e *cassavae*. O padrão de restrição do plasmídio da linhagem 275, quando digerido com *EcoRI*, foi semelhante aos padrões obtidos para as linhagens de *vesicatoria* 310 e 411. A linhagem 275 teve sensibilidade ao cobre pelo teste de determinação do nível de resistência, enquanto as linhagens 310 e 411 são respectivamente, de baixa e alta resistência. Estas diferenças podem ser explicadas por diferenças funcionais ao nível de regulação ou pela presença de mutações pontuais. Dados de sequenciamento podem vir a esclarecer esses resultados.



**Figura 2:** Hibridização do plasmídeo pRCV48, digerido com *EcoRI*, com a sonda 2A.1. (A) Eletroforese em gel de agarose 0,8% do DNA plasmidial da linhagem doadora 484 e da linhagem receptora RefSm. (B) Hibridização do "Southern blot" com a sonda 2A.1. (1)  $\lambda$  HindIII; (2) 484/*EcoRI*; (3) RefSm; (4) RefSm + pRCV48/*EcoRI*; (5)  $\lambda$  HindIII.



**Figura 3:** Hibridização do DNA plasmidial (p) e cromossômico (cr) de diferentes linhagens de *X.c.pv vesicatoria*, digeridos com *EcoRI*, com a sonda 2A.1. (A) Eletroforese em gel de agarose 0,8% de DNA plasmidial e cromossômico (B) Hibridização do "Southern blot" com a sonda 2A.1 (1) 310p; (2) 310cr; (3) 408p; (4) 408cr; (5) 411p; (6) 411cr; (7) 457p; (8) 457cr; (9) 479p; (10) 479cr; (11) 484cr; (12) 484p; (13) 2A.



**Figura 4.** Hibridização do DNA plasmidial (p) e cromossômico (cr) das linhagens *X.c. pv melonis* (68) e *X.c. pv cassavae*(275), digeridos com *EcoRI*, com a sonda 2A.1. (A) gel de eletroforese 0,8% do DNA plasmidial e cromossômico destas linhagens. (B) Hibridização do "Southern blot" com a sonda 2A.1. (1) 1Kb ladder; (2) 68p; (3) 68cr; (4) 275p; (5) 275cr; (6) 484p.

#### 4.4. Perfil plasmidial

A fim de detectar a presença de polimorfismo nos plasmídios portadores de determinante de resistência, foram analisados os perfis de restrição de uma linhagem de baixa resistência (310) e duas de alta resistência (411 e 484). Os plasmídios dessas linhagens foram extraídos e digeridos com as enzimas *EcoRI*, *PstI*, *HindIII* e *XhoI*.

O tamanho aproximado dos fragmentos foi obtido através do programa de computador ELETRO (Leite, A., comunicação pessoal) e estão descritos na tabela 5.

Nenhum dos três plasmídios apresentou sítios para *XhoI*. Os plasmídios pRCV31 e pRCV41, nativos das linhagens 310 e 411, respectivamente, apresentaram perfis de restrição bem semelhantes, tendo pelo menos 6 sítios para *EcoRI*, 7 sítios para *PstI* e pelo menos 9 sítios para *HindIII*. A diferença encontrada no tamanho dos fragmentos entre os plasmídios, obtidos com digestão para *EcoRI*, pode ser devido a erros de medição. Já a diferença de tamanho plasmidial encontrada após digestão com *PstI*, comparado com os outros tamanhos obtidos, pode ser explicada pela presença de fragmentos de igual tamanho, não detectados no gel. O tamanho médio desses plasmídios foi de 59,2 Kb para pRCV31 e 59,6 Kb para pRCV41.

O plasmídio pRCV48, nativo da 484, apresentou tamanho menor, sendo de aproximadamente 30,5 Kb. Possui 3 sítios para *EcoRI*, 5 sítios para *PstI* e 4 sítios para *HindIII*.

Tabela 5 - Perfil de restrição plasmidial das linhagens de *Xcv* resistentes ao cobre

Enzimas	de 310	411	484
restrição			
	21,2 <sup>a</sup>	22,0	14,3 <sup>c</sup>
	15,4 <sup>c</sup>	16,0 <sup>c</sup>	8,90
	12,0	12,0	7,90
<b>EcoRI</b>	6,00	6,00	
	5,50	5,50	
	3,80	3,83	
<b>TOTAL<sup>b</sup></b>	<b>64,0</b>	<b>65,3</b>	<b>31,1</b>
	14,9	14,9	15,2
	12,9	12,9	7,90
	7,11	7,11	4,90
<b>PstI</b>	5,83	5,83	2,80
	4,84	4,84	2,00
	3,56	3,56	
	2,23	2,23	
<b>TOTAL</b>	<b>51,4</b>	<b>51,4</b>	<b>32,8</b>
	20,5	20,5	21,1
	12,1	12,1	2,60
	8,96	8,96	2,40
	5,80	5,80	1,40
<b>HindIII</b>	4,20	4,20	
	3,65	3,65	
	3,22	3,22	
	2,58	2,58	
	1,00	1,00	
<b>TOTAL</b>	<b>62,0</b>	<b>62,0</b>	<b>27,5</b>

a: tamanho do fragmento em kilo bases (kb)

b: soma dos tamanhos dos fragmentos obtidos através das digestões enzimáticas

c: fragmentos que hibridizam com a sonda 2A.1

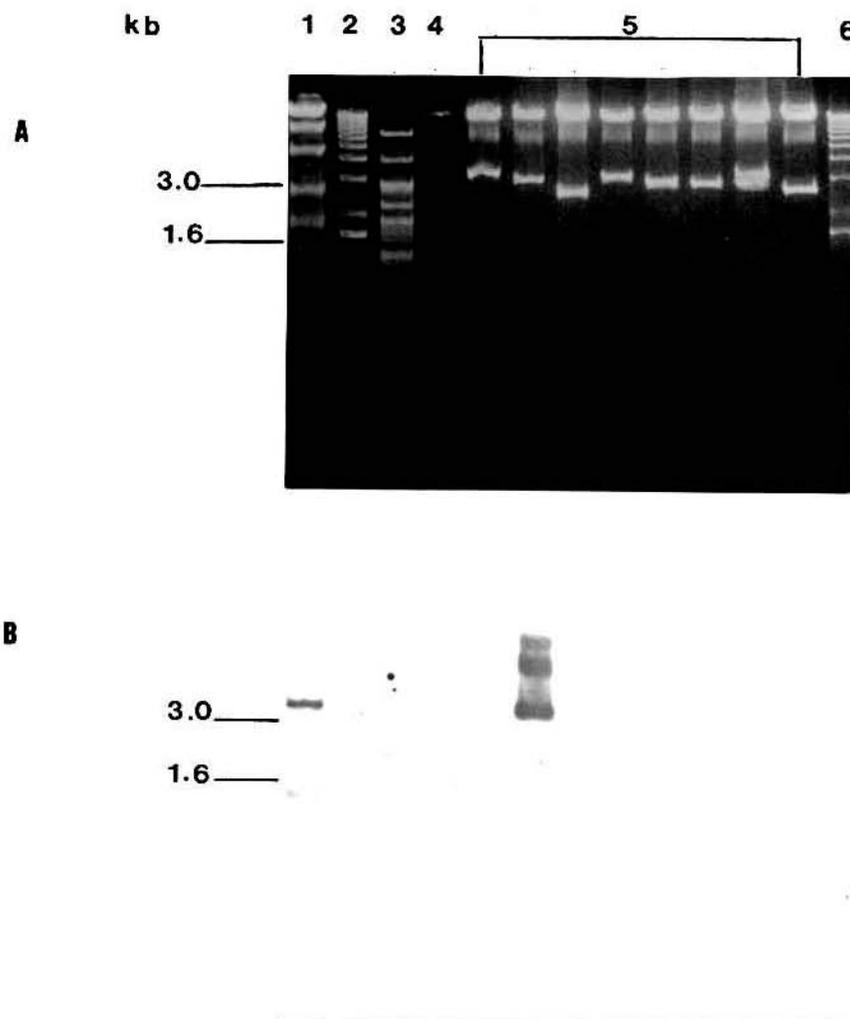
#### 4.5. Clonagem molecular

Em experimentos de hibridização detectou-se homologia entre a sonda 2A.1 com um fragmento de 3,1 Kb, obtido após digestão do pRCV48 com a enzima *PstI*.

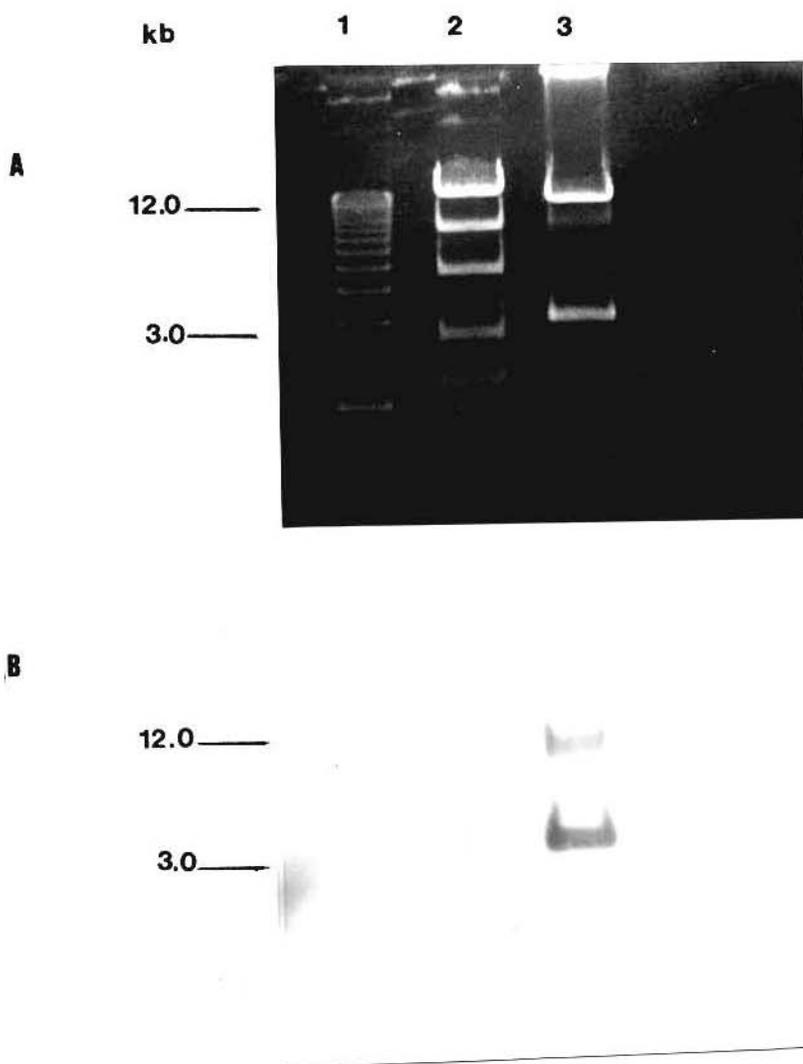
Após a ligação do vetor pMFY40 com este fragmento de aproximadamente 3,1 Kb do plasmídeo pRCV48 e transformação na DH5 $\alpha$ , obtiveram-se 8 possíveis clones portadores da resistência à tetraciclina e ao cobre. Estes clones foram isolados e, após extração de DNA e digestões com a enzima *PstI*, foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. Este material foi transferido e hibridizado com a sonda 2A.1 (Figura 5). Dos oito clones inicialmente obtidos, após a hibridização, ficou constatado a presença de um único clone com o gene de resistência ao cobre, o qual foi denominado de clone 2 VIII. O número em romano corresponde a placa de crescimento da colônia. Este clone possui o plasmídeo com o gene de resistência, que foi denominado de pCX.

A confirmação da origem do inserto de 3,1 Kb presente no clone 2VIII, foi efetuada pela hibridização do plasmídeo original pRCV48/*PstI* com o fragmento de 3,1 Kb marcado (Figura 6).

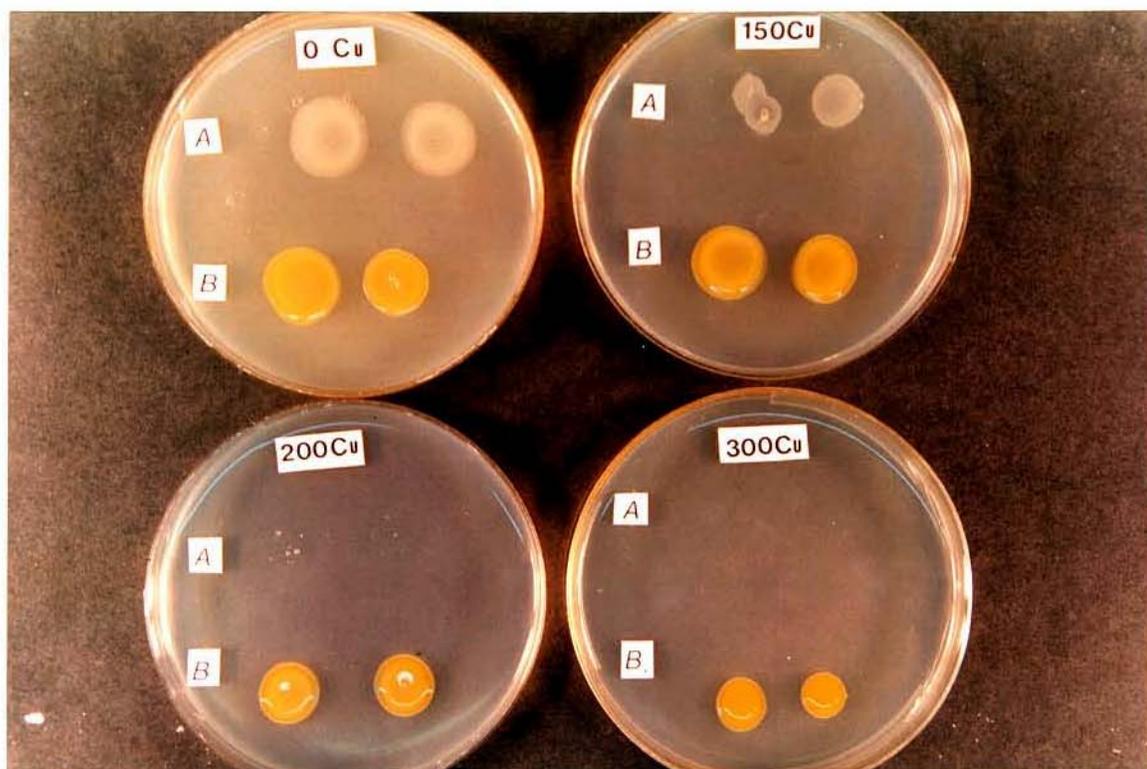
O clone 2VIII foi testado para o seu nível de resistência ao cobre como já descrito no item 3.3. Após 72 horas de crescimento a 28 °C, este clone teve seu crescimento inibido totalmente em placas com concentrações acima de 300  $\mu\text{g/ml}$ . Ficou determinado o seu CMI, com surgimento de colônias isoladas, em 200  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 7).



**Figura 5:** Hibridização do gene de resistência ao cobre, localizado em um fragmento *Pst*I de 3,1 Kb. (A) Eletroforese em gel de agarose 0,8% do DNA plasmidial da linhagem 484 e dos seus possíveis clones. (B) Hibridização do DNA plasmidial com a sonda 2A.1. (1) 484/*Pst*I; (2) ladder; (3) 484/*Hinc*II (4) pMFY40/*Pst*I; (5) clones/*Pst*I; (6) ladder.



**Figura 6:** Hibridização do pRCV48/*PstI*, nativo da linhagem 484, com o inserto de 3,1 Kb marcado, presente no pCX. (A) Eletroforese em gel de agarose 0,8% do DNA plasmidial da linhagem 484 e do clone 2VIII. (B) Hibridização do "southern blot" deste gel (1) ladder; (2) 484/*PstI*; (C) 2VIII/*PstI*.



**Figura 7:** Determinação do nível de resistência ao cobre do clone 2VII, o qual apresentou desenvolvimento de colônias isoladas a 200  $\mu\text{g/ml}$ . A linhagem 484 foi utilizada como controle, tendo crescimento conflente até 300  $\mu\text{g/ml}$ . (A) clone 2VIII; (B) 484.

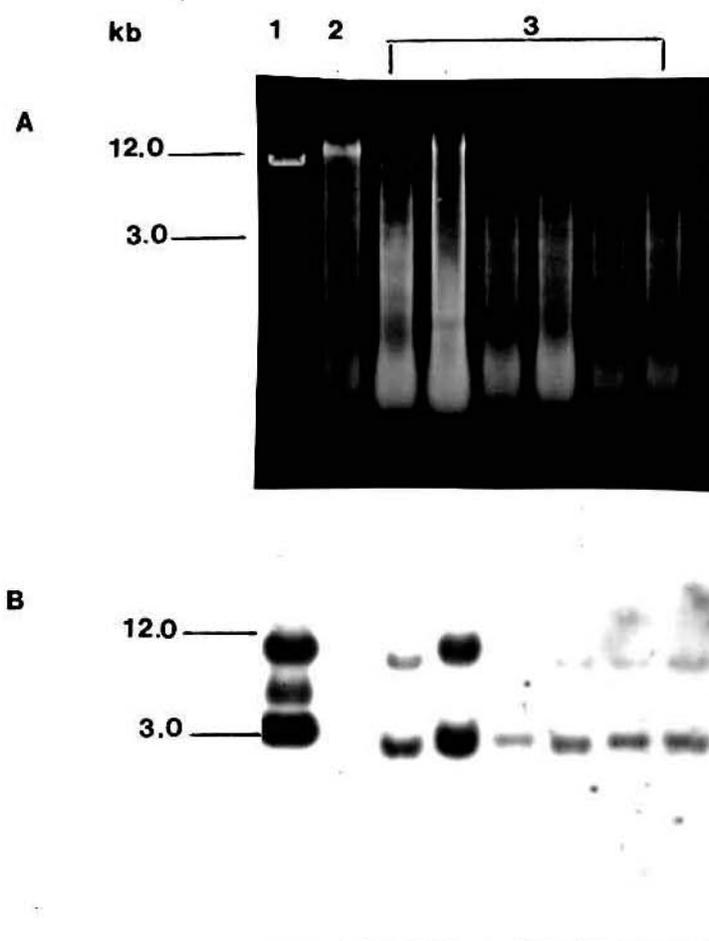
#### 4.6. Eletrotransformação

Foram obtidos 780 transformantes após a eletroporação da linhagem 457 com o DNA plasmidial do clone 2 VIII. Os transformantes foram plaqueados por ponto em placas contendo tetraciclina com réplica em placas com tetraciclina e cobre nas concentrações 100, 150 e 200  $\mu\text{g/ml}$ .

Dos 780 transformantes iniciais, 141 cresceram nas placas contendo cobre para a concentração de 100  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 8). Os DNAs plasmidiais de 10 transformantes, escolhidos ao acaso, não hibridizaram com o fragmento de 3,1 Kb. Desses transformantes, 6 tiveram o DNA total extraído e hibridizado com a mesma sonda. Houve hibridização na região correspondente ao inserto de 3,1 Kb do plasmídio pCX em todos os transformantes, não ocorrendo, entretanto, no DNA total da linhagem 457. O fragmento de 11,6 Kb, correspondente ao vetor pMFY40, também hibridizou com a mesma sonda, demonstrando integração do plasmídio pCX no cromossomo dessas bactérias (Figura 9).



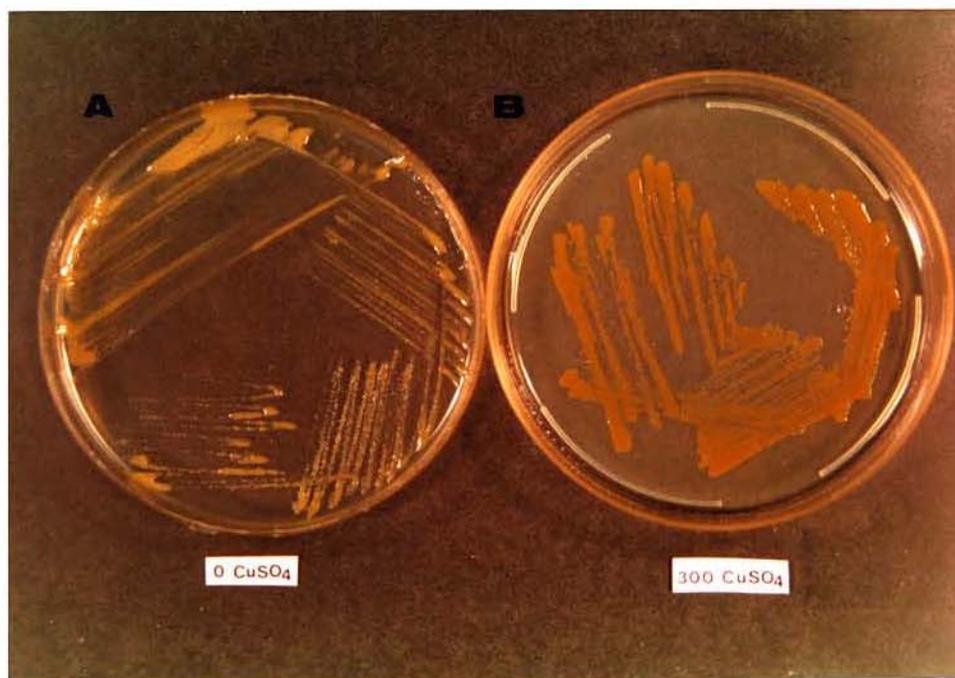
**Figura 8:** Crescimento dos transformantes 457 (pCX), obtidos por eletroporação, em meio com tetraciclina (A) e tetraciclina + cobre (B).



**Figura 9:** Identificação do plasmídeo pCX, integrado no cromossomo dos clones transformantes. (A) Eletroforese em gel de agarose 0,8% do plasmídeo pCX e dos DNAs cromossômicos digeridos com PstI. (B) Hibridização do "southern blot" com a sonda molecular do inserto de 3,1 Kb do pCX. (1) pCX; (2) 457; (3) clones.

#### 4.7. Mecanismo de resistência

A linhagem resistente ao cobre 484 foi crescida em meio NA com diferentes concentrações de sais de cobre. Após 72 horas de crescimento a 28°C, observou-se uma mudança de coloração da linhagem crescida em meio com cobre. A linhagem 484 apresenta uma coloração amarela, típica do gênero *Xanthomonas*, quando crescida em meio NA, sob condições normais. Esta coloração se modifica para uma tonalidade mais escura, após crescimento em meio NA suplementado com cobre (Figura 10).



**Figura 10:** Coloração da linhagem 484 crescida na ausência (A) ou presença de 300  $\mu\text{g/ml}$  de cobre (B). Período de incubação: 120 h.

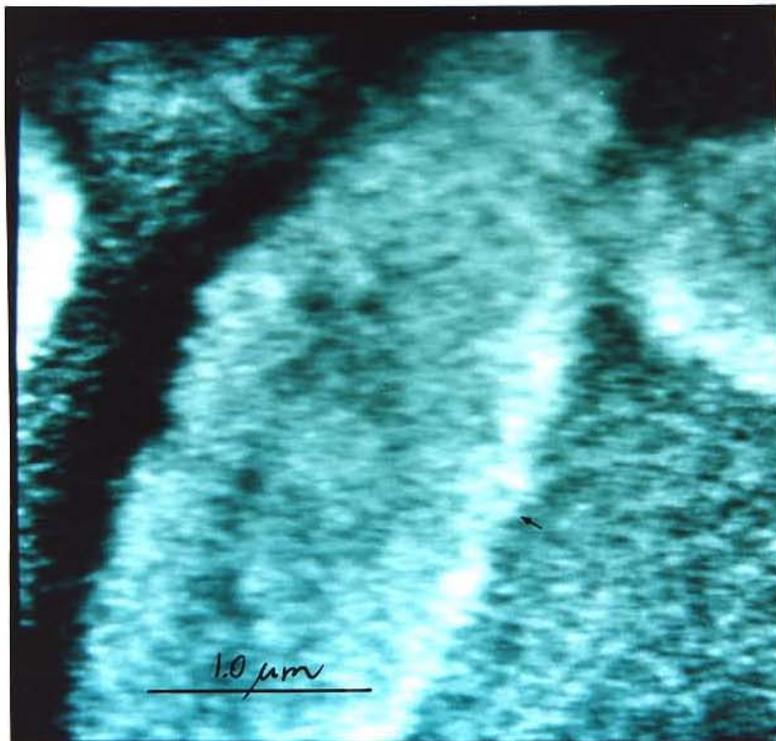
#### **4.7.1. Medidas de acumulação de cobre**

Após a leitura no espectrofotômetro de absorção atômica, constatou-se a presença de 10,83 ppm (mg/l) de cobre acumulado na linhagem resistente 484 e a ausência completa deste metal na mesma linhagem que cresceu em meio de cultura sem a presença de cobre. Caso o mecanismo de resistência fosse um mecanismo de efluxo, seria esperado que o nível de cobre medido pelo aparelho, após 16 a 18 horas de crescimento da bactéria com o metal, estivesse mais próximo de zero ou mais próximo do nível detectado pela mesma linhagem que cresceu sem o metal. Isto porque já é fato conhecido que altos níveis de cobre são tóxicos para a célula e, portanto, ele deve ser eliminado do seu interior.

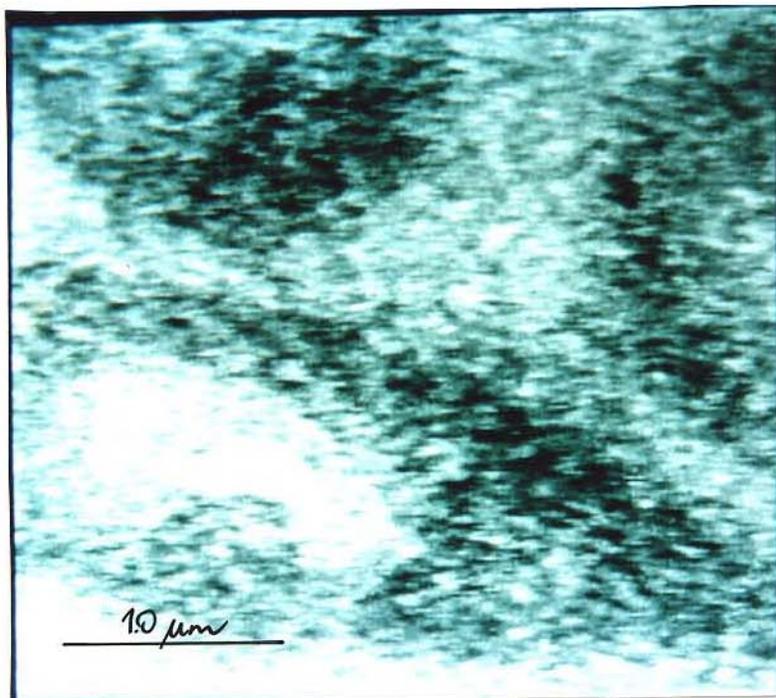
#### **4.7.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão**

As células da linhagem resistente ao cobre, 484, crescidas na presença ou ausência de cobre, foram analisadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão, através da técnica de Espectroscopia de Imagem de Elétrons, que identifica o metal presente na amostra através de uma coloração branca.

Nas células que cresceram na presença de cobre, ficou nítida esta coloração branca ao redor das células, identificando a presença de cobre especificamente na região da membrana celular (Figura 11A). Já nas células da mesma linhagem, mas que cresceram na ausência de cobre, não foi observado este tipo de coloração em qualquer parte da célula (Figura 11B).

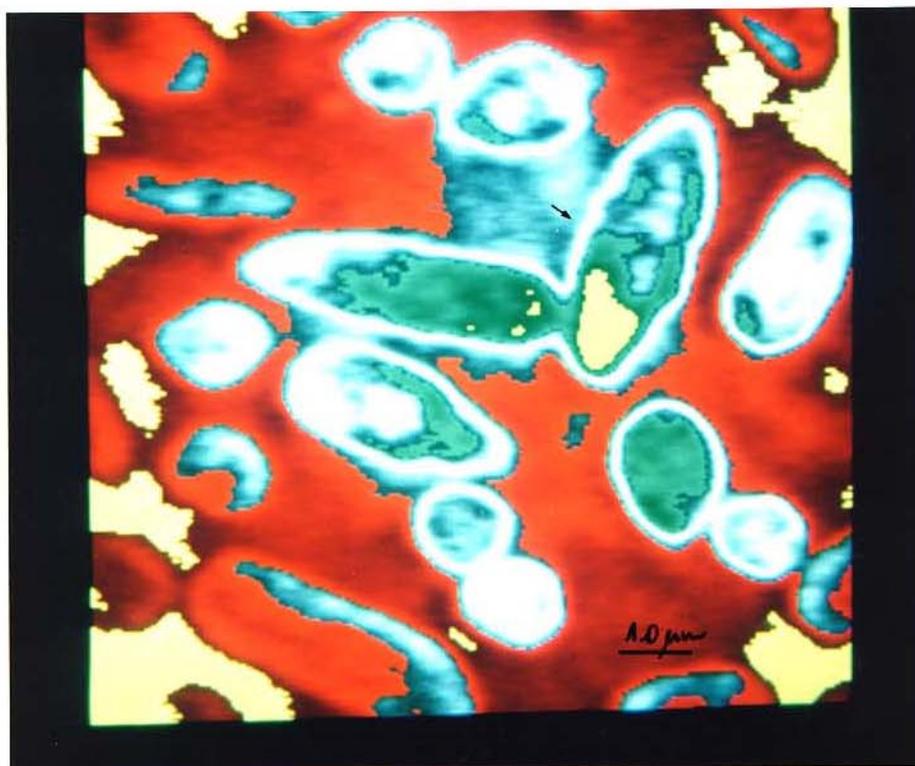


**Figura 11A:** Fotomicrografia de transmissão de células da linhagem 484 crescidas na presença de 200 µg/ml de cobre. O cobre está localizado na região da membrana celular (indicado pela seta).



**Figura 11B:** Fotomicrografia de transmissão de células da linhagem 484 crescidas na ausência de cobre.

A fim de confirmar a presença do metal na região da membrana celular, o mesmo material da Figura 11A foi analisado através do programa de computador IBAS (Novaes, S., comunicação pessoal), onde são distribuídos coloração igual para materiais similares. Pode-se perceber ao redor das células uma coloração branca, indicando a presença do mesmo tipo de material ao redor da membrana, sugerindo a presença do metal nesta região (Figura 12).

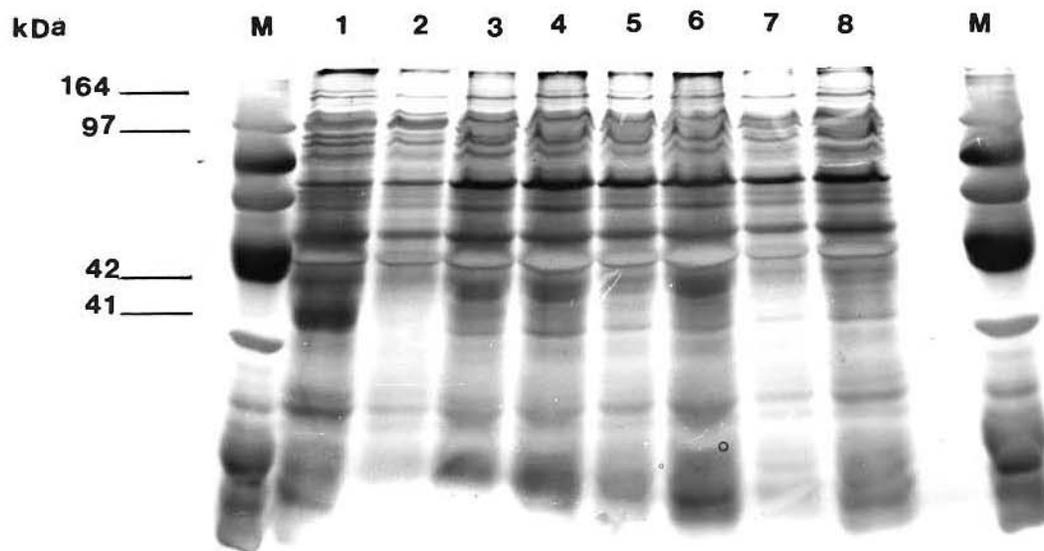


**Figura 12:** Presença de cobre na região da membrana celular da linhagem 484 (indicado pela seta), detectado através do programa IBAS, o qual distribui igual coloração para materiais semelhantes.

### 4.7.3. Perfil de proteínas totais das linhagens de *Xcv*

O perfil eletroforético de proteínas das linhagens 457 e 484 estão demonstrados na Figura 13. Após a indução e crescimento da linhagem 484 na ausência e presença de diferentes concentrações de cobre, foi obtido um padrão de proteínas bem semelhantes entre essas amostras. Apesar da baixa resolução do gel obtida, uma possível diferença entre elas pôde ser notada. Nesses resultados preliminares, uma proteína de aproximadamente 164 kDa parece ser expressa em maior nível nas linhagens que cresceram com cobre (linhas 4 a 8 da Figura 13). A mesma proteína, aparentemente, foi sintetizada em um nível bem reduzido quando comparada com as outras amostras. Cabe ressaltar que foram feitas tentativas de quantificação de proteínas pelos métodos de Lowry, Bradford e pela análise no espectrofotômetro, mas todas sem sucesso.

Por sua vez, a linhagem sensível 457, também apresentou mudanças na síntese de proteínas. Na ausência de cobre, uma proteína de igual tamanho da anterior foi expressa, mas teve sua síntese inibida quando crescida com 50  $\mu\text{g/ml}$  de cobre. Além disto, uma outra proteína de aproximadamente 41 kDa, foi inibida quando a linhagem cresceu com cobre (linhas 1 e 2, Figura 13).



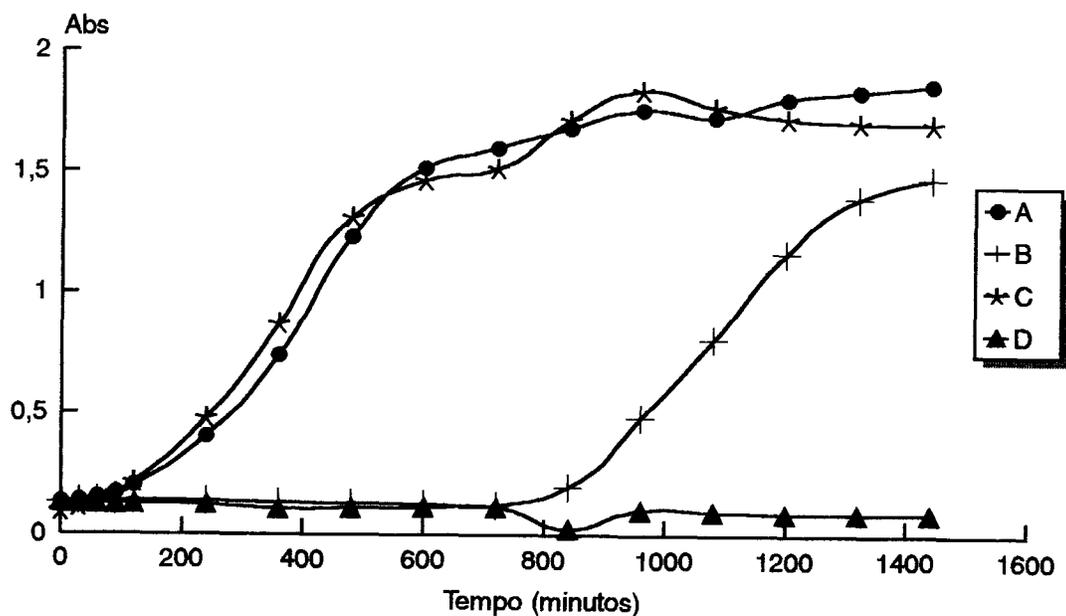
**Figura 13:** Gel SDS-PAGE 10% de proteínas totais de culturas de *Xcv*, em diferentes concentrações de cobre. Linhas (1) 457 crescida em meio NA; (2) 457 crescida com 50  $\mu\text{g/ml}$  de cobre; (3) 484 crescida em meio NA; (4) 484 crescida com 50  $\mu\text{g/ml}$ ; (5) 484 crescida com 100  $\mu\text{g/ml}$ ; (6) 484 crescida com 150  $\mu\text{g/ml}$ ; (7) 484 crescida com 200  $\mu\text{g/ml}$ ; (8) 484 crescida com 250  $\mu\text{g/ml}$  de cobre, respectivamente. M: marcador

#### 4.7.4. Indução do gene

Com a finalidade de verificar qual o mecanismo de regulação do gene de resistência ao cobre (indutivo ou constitutivo), a linhagem 484 foi analisada quanto à curva de crescimento, após crescimento prévio na ausência ou presença de cobre (Figura 14).

A linhagem 484, resistente ao cobre, crescida a partir de um pré-inóculo com  $50\mu\text{g/ml}$  de  $\text{CuSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ , apresentou início de crescimento exponencial durante os 30min (curva A). O seu crescimento coincide com o controle em que não foi adicionado cobre desde o início do experimento (curva C). Já a cultura bacteriana da linhagem 484 que não foi previamente exposta ao metal, apresentou uma fase de adaptação (fase lag) de cerca de 12 horas até a entrada na fase exponencial (curva B). Após 24 horas de crescimento, a medida de absorbância desta amostra, indica crescimento ascendente aproximando-se das curvas A e C, já em fase estacionária. A linhagem de *Xcv* 457, sensível ao cobre, não apresentou crescimento com  $250\mu\text{g/ml}$  de  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (curva D).

O pH do meio de cultura dessas linhagens foi medido, durante as diferentes fase de crescimento, sendo acertado inicialmente para 7,0 em todas as linhagens. Após a primeira medida de absorbância, o pH do meio se apresentou em torno de 5,0-6,0, com exceção da linhagem 484, que não cresceu com cobre em nenhuma etapa do experimento. Nas últimas medições, o pH de todas as linhagens era 8,0, exceto a linhagem 457 que manteve o pH em torno de 5,0.



**Figura 14:** Crescimento da linhagem 484, durante um período aproximado de 24 horas, na presença ou ausência de cobre, adicionado no meio de cultura. A linhagem foi crescida com 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de  $\text{CuSO}_4$ , após pré-crescimento com 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (curva A) ou após pré-crescimento na ausência de cobre (curva B). Os controles consistiram dessa linhagem crescida apenas em meio NA desde o início do experimento (curva C) e da linhagem 457,  $\text{Cu}^s$ , que teve pré-crescimento em NA, antes da adição de 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de  $\text{CuSO}_4$  (curva D).

## 5. Discussão:

### 5.1. Nível de resistência ao cobre

Das 29 linhagens de *Xanthomonas* testadas para determinação do nível de resistência a sulfato de cobre, 14 pertencem ao patovar *vesicatoria*. Destas, cerca de 40,9% apresentaram algum nível de resistência ao cobre, seja este nível alto ou baixo. Estas linhagens foram isoladas em diferentes regiões agrícolas, após a introdução do uso de defensivos à base de cobre (Rodrigues-Neto, comunicação pessoal). Dentre as linhagens altamente resistentes (Tabela 4), as linhagens 401, 411 e 484 foram isoladas nas cidades de Arealva, Monte-Mor e Presidente Prudente, respectivamente. A linhagem 462 é proveniente da Flórida e já havia sido anteriormente descrita como resistente ao cobre por Stall et al.(1986). Apesar dessas amostras serem originárias do Estado de São Paulo, o perfil de restrição plasmidial entre as linhagens 411 e 484 apresentado foi diferente (Tabela 5), assim como o tamanho do plasmídeo.

A linhagem 420, coletada na cidade de Santa Bárbara D'Oeste, apresentou resistência em um nível menor do que as linhagens 484, 411 e 401, demonstrando uma variação existente dentro do mesmo patovar. Dentre as linhagens sensíveis, cabe ressaltar o comportamento instável da linhagem 408 quanto ao nível de resistência. Inicialmente, a CMI da linhagem foi determinada entre 300 e 350  $\mu\text{g/ml}$  (dados não mostrados), sendo considerada de alta resistência. Posteriormente, novos testes foram realizados e a CMI detectada foi 100  $\mu\text{g/ml}$ . Esta linhagem foi mantida, através de repiques sucessivos, em meios de cultura sem a presença de cobre, fato este que pode ter contribuído na redução da CMI, possivelmente devido à perda plasmidial. Estes dados contrastam com os obtidos por Sundin et al. (1989), que mantiveram isolados de *Pseudomonas syringae* pv *syringae*, resistentes ao cobre, por mais de um ano, após 50 transferências em meio sem íons de cobre. Todos permaneceram resistentes, indicando uma alta estabilidade da resistência ao metal nessas linhagens. Por outro lado, não

houve hibridização do DNA genômico ou plasmidial da linhagem 408 com as sondas utilizadas nesse trabalho (Figura 3), confirmando a possibilidade da perda de resistência ao cobre.

Dos diferentes patovares de *Xanthomonas* testados, com exceção do patovar *vesicatoria*, nenhum deles apresentou CMI maior do que 100 µg/ml, tendo todos sensibilidade ao cobre. A baixa frequência de resistência ao cobre nesses patovares, pode ser atribuída à não utilização de agentes cúpricos em culturas de plantas não hospedeiras para o patovar *vesicatoria*, o que não ocorre em cultivares específicos do patovar. Esta baixa frequência pode ser obtida, quando os testes utilizados para detecção de linhagens resistentes envolvem apenas testes em placas. Entretanto, quando são utilizadas técnicas moleculares, como hibridizações com sondas específicas, há possibilidades de se detectar o gene de resistência. Esses resultados foram obtidos com o DNA plasmidial e genômico dos patovares *cassavae* (275) e *melonis* (68). A sensibilidade antes detectada, pode ser devido a não expressão desses genes de resistência nessas bactérias. Esses genes podem estar inativos ou ainda, há a possibilidade de ocorrência de uma mutação que possa ter levado um gene qualquer a tornar-se gene de resistência.

As linhagens de *E.coli*, em testes preliminares efetuados no laboratório, por estriagem das colônias em placas com meio LB contendo diferentes concentrações de cobre, foram classificadas como resistentes (dados não mostrados). Quando repetido o teste para detecção do nível de resistência utilizando-se a metodologia descrita no ítem 3.3, todas as linhagens se mostraram sensíveis, após 72 horas de crescimento a 37 °C. Este último método foi considerado mais preciso, porque teve como parâmetro a concentração de células iniciais, através de ajustes nas medidas de absorbância, podendo correlacionar resultados obtidos para diversas linhagens. Na primeira metodologia feita por estriagem, não há este mesmo tipo de controle, podendo ocorrer resultados divergentes dos iniciais.

Uma vez estabelecida a metodologia ideal, as mesmas linhagens de *E.coli* foram submetidas ao mesmo teste de determinação de CMI, utilizando o meio de cultura NA, ao invés de LB, permanecendo todas sensíveis ao metal. A troca no meio de cultura utilizado ocorreu, porque determinados ingredientes do meio de cultura, como extrato de levedura, podem complexar com íons metálicos presentes no meio e alterar a toxicidade do metal (Hughes & Poole, 1991).

A determinação do nível de resistência a metais, através da padronização das densidades celulares, tem sido utilizada por diferentes autores. Garde & Bender (1991), descreveram que linhagens de *Xcv*, isoladas de lesões foliares de tomateiros, apresentaram uma CMI de 1,4 mM (350 µg/ml), sendo resistentes a pulverizações de cobre. Anteriormente, esta mesma linhagem de *Xcv* tinha sido classificada como altamente resistente e portadora de uma CMI de 2,4 mM (600µg/ml), após estriagem das linhagens em meio NA com diferentes concentrações de cobre (Bender et al., 1990). Com a padronização do nível celular inicial utilizado, a CMI diminuiu aproximadamente a metade do valor anterior. Cooksey (1990), também determinaram a CMI de linhagens de *Pseudomonas* e *X. campestris* através desta mesma metodologia.

## **5.2. Localização plasmidial da resistência ao cobre**

O determinante de resistência ao cobre tem sido localizado em plasmídios de diferentes microrganismos (Stall et al., 1986; Erardi et al., 1987; Bender & Cooksey, 1987; Sundin et al., 1989; Bender et al., 1990). A maioria desses plasmídios são conjugativos podendo transferir o caráter de resistência para diferentes linhagens. O plasmídio nativo da linhagem 484 (pRCV48), descrito neste trabalho, também mostrou ter capacidade de se autotransferir para a linhagem RefSm, não portadora de plasmídios, sem auxílio de plasmídio mobilizador.

Apesar da baixa frequência obtida, parece improvável o surgimento desses transconjugantes por mutação espontânea. Isto porque os plasmídios isolados dos três transconjugantes, pRSC1, pRSC2 e pRSC3 (Tabela 2), apresentaram o mesmo perfil plasmidial entre si e com a linhagem doadora, quando digeridos com a enzima de restrição *EcoRI* (Figura 2). Aliado a esse fato, as hibridizações com as sondas 2A.1, 2B.1 e 2C.1, confirmam a procedência desses plasmídios da linhagem doadora e também a transferência do determinante de resistência ao cobre para esses transconjugantes. Tentativas de obtenção de mutantes resistentes ao cobre, através de crescimento de linhagens sensíveis, em placas gradientes de meio NA com concentrações crescentes de cobre, foram infrutíferas, sugerindo também a baixa frequência de mutação espontânea.

A baixa eficiência de conjugação está de acordo com observações feitas por Coplin (1989). Segundo esse autor, a transferência de plasmídios R, em um ambiente natural ou em condições experimentais de laboratório, ocorre em baixas frequências, mesmo sendo comum encontrar plasmídios conjugativos em diversas bactérias fitopatogênicas. O nível de resistência ao cobre da linhagem receptora foi aumentado cerca de 3X, após a introdução do plasmídio pRCV48, confirmando não só a presença, como também a expressão do gene de resistência.

Através de experimentos de hibridizações, pôde-se localizar o gene de resistência ao cobre em plasmídios nativos das linhagens 310, 411 e 484 (Figura 3). Os resultados de hibridização nos genes presentes nestas linhagens resistentes, indicam homologia de sequência dos genes de resistência ao cobre, presente em isolados brasileiros, com os genes de  $Cu^r$  das linhagens de *Xcv*, presentes em Oklahoma, EUA, de cujos DNAs plasmidiais foram construídas as sondas utilizadas neste trabalho (Figura 1).

Uma discussão sobre a origem da resistência a metais surgiu, a partir da constatação da existência de homologia desses determinantes de resistência com genes

cromossômicos. Bender et al. (1990) descrevem a ausência de homologia dos genes de resistência de *Xcv* com genes cromossômicos, favorecendo a idéia de que esses genes possam ter sido introduzidos nessas linhagens, ao invés de terem a sua origem em genes endógenos. Entretanto, observações divergentes foram encontradas com as linhagens da mesma espécie, descritas nesse trabalho. Em experimentos iniciais de hibridização, em condições de alta estringência, foi detectado fraca hibridização em uma região de aproximadamente 4,0 kb, presente nos cromossomos das linhagens sensíveis ao cobre 408, 457 e 479, quando digeridos com *EcoRI* (dados não mostrados). Resultados semelhantes obtidos por Cooksey (1993), sugerem a possibilidade da evolução do gene de resistência ao cobre, a partir de genes alocados no cromossomo dessas bactérias.

Após a identificação do gene de resistência em algumas linhagens de *Xcv*, foi analisada a possibilidade de dispersão desse gene em diferentes espécies. Não ocorreram hibridizações, das mesmas sondas utilizadas para *Xanthomonas*, com a linhagem de *Pseudomonas gladioli* pv *gladioli* e as duas linhagens de *E. coli* XA7012 e WM677. Ishihara et al. (1986), descreveram a linhagem XA7012 como portadora de resistência ao cobre. Entretanto, esta mesma linhagem se mostrou sensível ao cobre pelo teste de resistência estabelecido neste trabalho, e, ao mesmo tempo, não ocorreu hibridização com as sondas 2A.1, 2A.2 e 2A.3. Por estes resultados obtidos, pode-se supor que esta linhagem possa ter perdido o caráter de resistência ao metal ou o teste de resistência não foi sensível o bastante para detectar o nível de tolerância específico para esta linhagem. Além destas suposições, a ausência de hibridização pode ter ocorrido devido a não existência de homologia de sequência do gene  $Cu^r$  da linhagem XA7012 com as linhagens de *Xcv* resistentes, aliado ao fato que essas linhagens pertencem a espécies diferentes.

Os resultados obtidos, como anteriormente citados, indicam que os plasmídios das linhagens de *Xcv* resistentes, utilizadas nesse trabalho, apresentam homologia com os genes presentes no plasmídio pXV10A, isolado nos EUA. Em relação ao tamanho

do plasmídio, a diferença é muito grande, já que este último tem 110 Kb. Contudo, parece ser relativamente comum, a localização desses genes de resistência ao cobre, em plasmídios que apresentam polimorfismos de tamanho. O plasmídio pRCV48 tem cerca de 30,5 kb. Dittapongpitch & Ritchie (1993) descreveram a existência de miniplasmídios de tamanhos variáveis de 2,5, 2,28, 1,8 e 1,7 Kb em *Xcv*, responsáveis por esta resistência. O gene de resistência no plasmídio pXV10 encontra-se localizado em um fragmento *HindIII* - *BglIII* de cerca de 4,0 kb. Já o gene presente no plasmídio pRCV48, está localizado em um fragmento *PstI* de 3,1 kb. Por sua vez, o plasmídio de *Pseudomonas*, descrito por Bender & Cooksey (1987), apresenta algumas similaridades com o plasmídio pRCV48. Além de possuir 35 kb, apresentando um tamanho mais próximo ao pRCV48, o gene de resistência ao cobre está localizado em um fragmento *PstI* de 4,4 kb. Contudo, após digestões com diferentes enzimas, o padrão de restrição obtido com a digestão por *EcoRI*, foi divergente, tendo o plasmídio de *Pseudomonas* 4 sítios a mais para esta enzima.

Uma análise dos padrões de restrição do DNA plasmidial das linhagens resistentes, foi feito com o objetivo de se observar a existência de polimorfismo entre eles. Os padrões de restrição dos plasmídios pRCV31 e pRCV41, das linhagens 310 e 411, respectivamente, apresentaram grande identidade, sugerindo a conservação do mesmo plasmídio nestas linhagens. Já o plasmídio pRCV48, nativo da linhagem 484, apresentou não só padrão divergente de restrição, variando no número de sítios de diferentes enzimas, mas também um tamanho menor, quando comparado com as linhagens anteriores (Tabela 5).

A existência de polimorfismo entre plasmídios de *Xcv* resistentes ao cobre, já foi relatado por Bender et al. (1990), onde os plasmídios apresentam padrões de restrição diferentes. No entanto, 12 diferentes linhagens de *Pseudomonas syringae* pv *tomato* descritas por Cooksey (1987), apresentaram conservação de um plasmídio de 35 Kb, responsável pela resistência ao cobre. O mesmo perfil plasmidial foi obtido quando

os plasmídios foram digeridos com *EcoRI* e *PstI*. Além disso, o gene de  $Cu^r$  clonado, hibridizou com um fragmento de mesmo tamanho nos plasmídios das 12 linhagens.

A linhagem 484, juntamente com a linhagem 411, possuem altos níveis de resistência ao cobre. Pelo perfil plasmidial, elas possuem plasmídios diferentes, mas que podem apresentar homologia de sequência do gene, já que ambos hibridizam com a sonda 2A.1. Por sua vez, o plasmídio pRCV31, apesar de ter um padrão de restrição semelhante ao plasmídio pRCV41, e hibridizar com a sonda 2A.1 em um fragmento de tamanho semelhante ao deste plasmídio (Figura 3), apresenta um nível de resistência bem menor. A razão para essa diferença na sensibilidade ao cobre não é clara, mas esses genes, apesar da comprovada semelhança, podem diferir funcionalmente ao nível de regulação. A linhagem 310 poderia possuir um promotor fraco, tendo um nível de expressão do gene reduzido. Não pode ser também descartada a hipótese da ocorrência de uma mutação, modificando a sensibilidade da linhagem, ao cobre. Uma outra possível explicação, relacionada com o número de cópias do plasmídio, não se aplica, porque os plasmídios pRCV31 e pRCV41 têm tamanho aproximado, mas níveis de resistência diferentes.

### 5.3. Clonagem e expressão do gene de resistência ao cobre

A linhagem 484 foi escolhida para experimentos de clonagem do gene  $Cu^r$  e para o estudo dos mecanismos de resistência ao cobre, por ter apresentado alto nível de resistência. Ela apresenta um plasmídio nativo, cujo tamanho médio é de 30,5 kb, com sítios de restrição para as enzimas *PstI* (5 sítios), *HincII* (10 sítios), *EcoRI* (3 sítios) e *XbaI* (5 sítios). Os fragmentos de restrição obtidos foram hibridizados com a sonda de  $Cu^r$ , sendo constatados que o gene de resistência possui sítios internos de restrição para as enzimas *PstI* (fragmentos de 3,1 kb e 1,3 kb) e *HincII* (fragmentos de 1,6 e 0,5 Kb). (Dados não mostrados) Cabe ressaltar que tentativas de clonagem do fragmento

*PstI* de 1,3 kb também foram realizadas, com o objetivo de se clonar o gene inteiro. Mas essas tentativas não obtiveram êxito.

O determinante de resistência ao cobre, localizado no plasmídio pRCV48, foi clonado no vetor pMFY40 como um fragmento de 3,1 kb, o qual hibridiza com a sonda 2A.1. Este plasmídio passou a ser chamado de pCX, que, além da marca de resistência ao metal, possui também a marca de resistência à tetraciclina. Hibridizações DNA - DNA do clone 2VIII, que contém o pCX, e da linhagem 484 digerida com *PstI*, foram realizadas para confirmar a origem do fragmento de 3,1 kb. A sonda utilizada foi o inserto marcado, sendo constatada a procedência do inserto da linhagem 484. O fato do fragmento ser quase imperceptível no perfil de restrição apresentado pela linhagem, sugere a possibilidade da existência de um outro plasmídio, de maior tamanho, que poderia ter o determinante de resistência. Esta suposição necessita de confirmação experimental.

Na figura 5, pôde-se observar hibridização menos intensa dos vetores, quando comparado com a hibridização do vetor do clone positivo, 2VIII. Este fato, favorece a idéia de que a intensidade de hibridização observada na região de 11,6 kb, correspondente ao vetor, foi mais intensa devido a presença de DNA do pCX digerido parcialmente. Isto também não descarta a existência de uma pequena homologia da sonda com o vetor. Cooksey et al. (1990), obtiveram homologia do vetor pLAFR3 com a sonda do operon *cop* de *Pseudomonas syringae* pv *tomato*. Este plasmídio expressou resistência ao cobre, como pode ser verificado na figura 7, permitindo o crescimento da linhagem DH5 $\alpha$  até o nível de 200  $\mu$ g/ml. Os resultados obtidos contrastam com aqueles descritos por Brown et al. (1992), que não obtiveram expressão do determinante de resistência ao cobre de *Xc* pv *vesicatoria* em *E. coli*. Uma região promotora, induzida pelo cobre em linhagens de *Xcv*, também não foi expressa em linhagens de *Pseudomonas* (Voloudakis & Cooksey, 1992).

Experimentos de eletroporação foram conduzidos em *Xcv* (linhagem 457, sensível ao cobre) para introdução do plasmídeo pCX. Os transformantes 457 (pCX) obtidos expressaram resistência ao cobre, ainda que em um nível reduzido, talvez porque o gene estivesse incompleto, afetando de alguma forma a sua expressão. A fim de se certificar da presença do pCX na linhagem 457, novas hibridizações foram feitas entre os DNAs plasmidiais desses transformantes e o inserto marcado. Como não ocorreu hibridização, a hipótese de integração do pCX no cromossomo dos transformantes foi estabelecida e confirmada, após hibridização com o DNA cromossômico (Figura 9). A integração do pCX no cromossomo desses clones pode ter ocorrido, devido à presença de homologia do vetor pMFY40 com o DNA genômico da linhagem 457, já que não houve hibridização do DNA genômico com o inserto marcado. Os transformantes 457 (pCX) passaram a apresentar um nível de resistência moderado ao cobre. Os transconjugantes RSCu1, RSCu2 e RSCu3, citados anteriormente, apresentaram um nível de resistência bem maior (300-350  $\mu\text{g/ml}$ ), após a introdução do plasmídeo pRCV48. Nesses transconjugantes o gene de resistência apresenta-se inteiro, enquanto nos transformantes 457 (pCX), o gene está incompleto. Este fato, pode vir a confirmar a necessidade do gene completo para a obtenção de um alto nível de expressão.

Uma outra possível explicação para o nível reduzido de expressão, seria a ocorrência de uma mutação, durante o processo de integração do pCX no cromossomo da linhagem 457. Esta mutação poderia ter afetado uma região cromossômica, responsável pela ativação do mecanismo de resistência plasmidial. Brown et al. (1992) relataram a existência de um locus cromossômico envolvido na regulação do nível de cobre, em *E.coli*. Além disso, o número de cópias do gene presente em plasmídios é maior que no cromossomo. Uma vez que o pCX tenha integrado no cromossomo, a expressão do gene de resistência poderia ser menor. Dependendo da posição de integração, esta expressão também poderia ser alterada.

#### 5.4. Mecanismo de resistência ao cobre

Durante os experimentos de determinação do nível de tolerância ao cobre, observou-se uma mudança da coloração da linhagem resistente, em meio NA complementado com cobre (Figura 10). Por possuir uma coloração amarela devido ao pigmento xantomonadina, a colônia passou a apresentar uma coloração amarelo escuro com tons de marrom, após reação com sulfato de cobre, cuja cor característica é azul. Além disso, o meio de cultura com cobre tinha o tom de azul inicial modificado, tornando-se mais claro. A alteração na coloração fica mais evidente, com o aumento do tempo de cultivo da bactéria no meio com o metal.

Esta mudança de coloração, levou à suposição do envolvimento de um mecanismo de resistência relacionado com o sequestro dos íons de cobre. Esta hipótese foi confirmada após leitura no espectrofotômetro de absorção atômica, indicando acumulação de cobre pela linhagem 484.

Acumulação de cobre como mecanismo de resistência foi também sugerido em *Pseudomonas syringae* (Cooksey & Azad, 1992) e em algas verdes (Silverberg et al., 1976). Este mecanismo de resistência ainda não foi descrito em *Xanthomonas*, onde tem sido proposto o mecanismo de resistência por efluxo, à semelhança de *E.coli* (Rough et al., 1985; Voloudakis et al., 1993).

A confirmação de que o cobre, em excesso, fica na região da membrana, ao invés de entrar para o citoplasma da célula, veio com os dados de microscopia eletrônica (figura 11A, 11B e 12).

Experimentos de indução feitos com a linhagem 484, sugerem que a resistência ao cobre, codificada pelo plasmídeo pRCV48, possa ser induzível (Figura 14). A indução de genes de cobre relacionadas a plasmídios já foi descrito para *E.coli*

(Rough et al., 1985), *P.syringae* (Mills et al., 1993), *Staphylococcus aureus* e *P.aeruginosa* (Weiss et al., 1977).

Pelos resultados apresentados neste trabalho, parece ser necessário um tempo de adaptação, após a adição do cobre. O tempo de fase lag é variável dependendo da espécie analisada. Por exemplo, *S.aureus* apresentou uma fase lag de 5 a 7 horas quando expostos a concentrações de 3 a 6 mM de arsenato (Weiss et al., 1977). Linhagens de *Alcaligenes eutrophus*, portadoras do determinante *czc* (resistência a cobalto, zinco e cádmio), reduzem o nível intracelular dos metais, através de um sistema de efluxo e reassumem o crescimento, após 12 a 24 horas de fase lag (Siddiqui et al., 1988). Em *E. coli*, esta fase lag foi aproximadamente de 2 horas e meia e dependente da concentração de cobre inicial (Rouch et al., 1985).

A toxicidade do cobre para a bactéria parece estar relacionada com a presença de íons de cobre em solução e essa toxicidade pode sofrer influências do pH. Nas condições de crescimento celular realizadas neste trabalho, a linhagem resistente ao cobre, 484, apresentou variações no nível de pH em diferentes fases de crescimento. Esta mesma linhagem, que não tinha sido induzida inicialmente pelo cobre, não cresceu, em experimento realizado com condições similares, quando o pH se manteve em 5,0, por razões desconhecidas (dados não mostrados). Uma possível explicação é que em pHs acídicos, íons de cobre permanecem livres em solução, sendo tóxicos para as bactérias. No caso da linhagem 457, cujo fenótipo é de sensibilidade ao cobre, por não possuir um mecanismo de proteção contra esses íons livres em solução, seu pH foi mantido em 5,0, não ocorrendo crescimento celular (Figura 14). Durante o crescimento das células resistentes, os íons de cobre, antes livres em solução, são complexados com alguma substância, provavelmente proteína, diminuindo assim, sua toxicidade para as células. Diversas publicações descrevem resultados semelhantes, confirmando essas observações (Erardi et al., 1987; Rowbury et al., 1992; Lee et al., 1993).

Uma vez constatado o sistema indutivo de resistência ao cobre, supôs-se a ocorrência de indução de proteínas específicas, que se ligariam aos íons de cobre, quando o seu nível ultrapassasse a faixa aceita em condições traços, pela bactéria.

Para dar suporte a essa idéia, foram obtidos os perfis de proteínas totais das células crescidas na ausência e presença de diferentes concentrações de cobre (Figura 13). Pôde-se observar a presença de uma proteína de aproximadamente 164 KDa de peso molecular, presente em maiores quantidades nas células induzidas. Aparentemente, não houve diferenças na expressão dessa proteína, quando a célula resistente foi crescida com concentrações crescentes de cobre. O aparecimento dessa proteína em maior nível de expressão, após a indução da célula resistente, pode sugerir a existência de um sistema indutível pelo cobre. Talvez, ela possa ser responsável pela ligação aos íons de cobre, impedindo sua entrada no interior da célula. Esses resultados são preliminares, estimulantes e necessitam de repetições para uma possível confirmação.

Diversos trabalhos já publicados especulam e também confirmam, a existência de proteínas envolvidas na resistência a metais. Resistência induzida por íons de zinco, em *Bacillus subtilis*, parece estar relacionada à expressão de uma proteína de 150 KDa e desaparecimento de outra de 127 KDa (Podlesek et al., 1993). Outros trabalhos, também envolvem proteínas de diferentes pesos moleculares, no mecanismo de resistência ao cobre em *Pseudomonas* (Cha & Cooksey, 1991; Cooksey & Azad, 1992) e em *Vibrio alginolyticus* (Harwood-Sears & Gordon et al., 1990).

Mecanismos e estratégias diferentes são adotados por organismos, para poderem sobreviver em ambientes com altos níveis de metais. Como esse metal acumulado nas células, entre as que adotam este tipo de mecanismo, pode interferir na duplicação do DNA ou como ele é distribuído entre as células filhas, ainda não foi elucidado.

## 6. CONCLUSÃO

O trabalho aqui apresentado é um estudo inicial sobre a resistência ao cobre em *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. Pelos resultados obtidos, pode-se verificar que a resistência ao cobre nesta bactéria envolve mecanismos de regulação ainda não bem estabelecidos. Este estudo está tendo continuidade no laboratório, onde o gene de resistência clonado no plasmídeo pCX, está sendo subclonado no vetor KS (pBluescript) para posterior sequenciamento. A partir desses dados, serão definidas as regiões requeridas para a resistência e os possíveis produtos desse gene.

A princípio, podemos descrever brevemente, as seguintes conclusões:

(1) Após testes para determinação do nível de resistência ao cobre, *in vitro*, ficou constatado a existência de linhagens de *X.campestris* pv *vesicatoria* resistentes ao cobre em diferentes localidades do Estado de São Paulo;

(2) Existem variações no nível de resistência dentro do mesmo patovar;

(3) Nas linhagens resistentes de *Xcv*, o gene de resistência está localizado em plasmídios;

(4) O plasmídeo pRCV48 mostrou ser conjugativo, podendo transferir o caráter de resistência para diferentes linhagens;

(5) Os plasmídios responsáveis pelo determinante de resistência ao cobre, apresentam polimorfismo de restrição e de tamanho;

(6) O gene de resistência do plasmídeo pRCV48, presente em um fragmento *PstI* de 3,1 Kb, foi clonado no vetor pMFY40, dando origem ao plasmídeo pCX;

(7) Há expressão do gene de resistência de *Xcv* no patovar *campestris* e na espécie *E.coli*;

(8) O mecanismo de resistência codificado por esses plasmídios é indutivo e envolve acumulação de cobre na região da membrana celular.

(9) Embora os dados sejam preliminares, parece haver envolvimento de uma proteína de 164 KDa na resistência ao cobre.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- AGRIOS, G.N. *Plant Pathology* 1989. 3<sup>rd</sup> Ed. Academic Press, Inc. San Diego, California.
- BARRERE, G.C.; BARBER, C.E. & DANIELS, M.J. 1986. Molecular cloning of genes involved in the production of the extracellular polysaccharide xantham by *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. *Int. J. Biol. Macromol.* 8:373-374.
- BEAULIEU, C., MINSAVAGE, G.V., CANTEROS, B.I. & STALL, R.E. 1991. Biochemical and genetic analysis of a pectate lyase gene from *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *Mol. plant-microbe Interac.* 4:446-451.
- BENDER, C.L. & COOKSEY, D.A. 1986. Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv *tomato*: conjugative transfer and in copper resistance. *J. Bacteriol.* 172(1):143-148.
- BENDER, C.L. & COOKSEY, D.A. 1987. Molecular cloning of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv *tomato*. *J. Bacteriol.* 169(2):470-474.
- BENDER, C.L.; MALVICK, D.K., CONWAY, K.E., GEORGE, S. & PRATT, P. 1990. Characterization of pXV10A, a copper resistance plasmid in *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:170-175.
- BITTON, G. & FREIHOFER, V. 1978. Influence of extracellular polysaccharides of copper and cadmium toward *Klebsiella aerogenes*. *Microbial Ecology* 4:119-125.
- BIRNBOIM, H.C. & DOLY, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Ac. Res.* 7:1513-1523.
- BLUM, H.; BEIER, H. & GROSS, H.J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis* 8:93-99.
- BOYER, H.W. & ROULAND-DUSSOIX, D. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41:459.

- BOWLES, D. 1990. Signals in the wounded plant. *Nature* 243:314-315.
- BROWN, N.L., ROUCH, D.A. & LEE, B.T.O. 1992. Copper resistance determinants in bacteria. *Plasmid* 27:41-51.
- CHA, J-S. & COOKSEY, D.A. 1991. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 88:8915-8919.
- COOKSEY, D.A. 1987. Characterization of a copper resistance plasmid conserved in copper-resistance strains of *Pseudomonas syringae* pv *tomato*. *Appl. Environ. Microbiol* 53:454-456.
- COOKSEY, D.A. 1988. Reduction of infection by *Pseudomonas syringae* pv *tomato* using a nonpathogenic, copper resistant strain combined with a copper bactericide. *Phytopathology* 78:601-603.
- COOKSEY, D.A. 1990. Genetics of bactericidiae resistance in plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28:201-219.
- COOKSEY, D.A., AZAD,R.H., CHA, J-S. & LIM, C-K. 1990. Copper resistance gene homologs in pathogenic and saprophytic bacterial species from tomato. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:431-435.
- COOKSEY, D.A. & AZAD, H.R. 1992 Accumulation of copper and other metals by copper-resistant plant-pathogenic and saprophytic Pseudomonads. *Appl Environ. Microbiol.* 58:274-278.
- COOKSEY, D.A. 1993. Copper uptake and resistance in bacteria. *Mol.Microbiol.* 7:1-5.
- COPLIN, D.L. 1989. Plasmid and their role in the evolution of plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev.Phytopathol.*27:187-212.
- DANIELS, M.J., BARBER,C.E., TURNER, P.C., CLEARY, W.G. & SAWZC, M.K. 1984. Isolation of mutants showing altered pathogenicity. *J. Gen. Microbiol.* 130:2447-2455.

- DANIELS, M.J., DOW, J.M. & OUSBORN, A.E. 1988. Molecular genetics of pathogenicity in phytopathogenic bacteria. *Ann Rev. Phytopathol.* 26:285-312.
- DITTA, G., STANFIELD, S., CORBIN, D. & HELINSKI, D. 1980. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium melioli*. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 77:7347-7351.
- DITTAPONGPITCH, V. & RITCHIE, D.F. 1993. Indigenous miniplasmids in strains of *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *Phytopathology* 83:959-964.
- DIXON, R. & LAMB, C.J. 1990. Molecular communications in interactions between plants and microbial pathogens. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 41:339-367.
- 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.* 31:261-271.
- ERARDI, F.X., FAILLA, M. L. & FALKINHAM III, J.O. 1987. Plasmid encoded copper resistance and precipitation by *Mycobacterium scrofulaceum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1951-1954.
- FOSTER, P. 1977. Copper exclusion as a mechanism of heavy metal tolerance in a green alga. *Nature* 269:322-323.
- FUKUDA, D.H. & YANO, K. 1985. Construction of broad host range cloning vectors for gram-negative bacteria. *Agric. Biol. Chem.* 49:2719-2724.
- GADD, G.M. & WHITE, C. 1985. Copper uptake by *Penicillium ochro-chloron*: influence of pH on toxicity and demonstration of energy -dependent copper influx using protoplasts. *J. Gen. microbiol.* 131: 1875-1879.
- GANJE, T.J. & PAGE, A.L. (1974) Rapid acid dissolution of plant tissue for cadmium determination by atomic absorption spectrophotometry. *Atomic Absorption Newsletter.* 13:131-134.

- GARDE, S. & BENDER, C.L. 1991. DNA probes for detection of copper resistance genes in *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2435-2439.
- GORDON, A. S., HARWOOD, V.J. & SAYAR, S. 1993. Growth, copper-tolerant cells, and extracellular protein in copper stressed chemostat cultures in *Vibrio alginolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:60-66.
- GOSS, T.J.; O'HARA, G.W.; DILWORTH, M.J. & GLENN, A.R. 1990. Cloning characterization, and complementation of lesion causing acid sensitivity in Tn5-induced mutants of *Rhizobium melilot* WSM419. *J. Bacteriol.* **172**:5173-5179.
- GOTO, M., HIKOTA, T., KYUDA, T. & NAKAJIMA, M. 1993. Induction of copper resistance in Plant-Pathogenic Bacteria Exposed to Glutamate, Plant Extracts, Phosphate Buffer, and Some Antibiotics. *Phytopathology* **83**: 1449-1453.
- HANAHAH, D. 1983. Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **41**:459.
- HARDING, N.E., CLEARY, J.M., CABANAS, D.K., ROSEN, I.G. & KANG, K.S. 1987. Genetical and physical analyses of a cluster of genes essential for xanthan gum biosynthesis in *Xanthomonas campestris*. *J. Bacteriol.* **169**: 2854-2861.
- HARWOOD-SEARS, V. & GORDON, A. 1990. Copper-induced production of copper-binding supernatant proteins by the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1327-1332.
- HIGHAM, D.P., SADLER, P.J. & SCAWEN, M.D. 1984. Cadmium-resistant *Pseudomonas putida* synthesizes novel cadmium proteins. *Science* **225**:1043-1046.

- HUGHES, M.N. & POOLE, R.K. 1991. Metal speciation and microbial growth-the hard (and soft) facts. *J. Gen. Microbiol.* **137**:725-734.
- ISHIHARA, M., KAMIO, Y. & TERAWAKI, Y. 1978. Cupric ion resistance as a new genetic marker of a temperature sensitive R plasmid, Rts1 in *Escherichia coli*. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* **82**:74-80.
- JONES, J.B., WOLTZ, S.S., JONES, J.P. & PORTIER, K.L. 1991. Populations dynamics of *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* on tomato leaflets treated with copper bactericides. *Phytopathology* **81**: 714-719.
- KEARNEY, B. & STASKAWICZ, B.J. 1990. Characterization of IS476 and its role in bacterial spot disease of tomato and pepper. *J. Bacteriol.* **172**:143-148.
- KUNZ, M., MÖLLER, HENRICH, U.-R. & CANTOW, H.-J. 1989. Electron Spectroscopic Imaging studies on semycrystalline and block-copolymer systems. *Makromol.Chem., Macromol. Symp.***23**: 57-72.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:686-685.
- LANZA, S.A. & ROSATO, Y.B. 1986. Produção de goma xantana por diferentes mutantes e recombinantes de *Xanthomonas campestris*. In: Reunião Anual de Genética de Microrganismo, Ribeirão Preto.
- LEE, Y.A., SCHROTH, M.N., HENDSON, M., LINDOW, S.E., WANG, X.I., OLSON, B., BUCHNER, R.P. & TEVIOTDALE, B. 1993. Increased toxicity of Iron-amended copper containing bactericides to the walnut blight pathogen *Xanthomonas campestris* pv *juglandis*. *Phytopathology* **83**:1460-1465.
- LEONG, S.A., DITTA, G. S. & HELINSKY, D.R. 1982. Heme biosynthesis in *Rhizobium*. Identification of a cloned gene coding for amino levullinic acid synthetase from *Rhizobium melliott*. *J. Biol. Chem.* **257**: 8724-8730.

- LERCH, K. 1980. Copper metallothionein, a copper-binding protein from *Neurospora crassa*. *nature* 284:368-369.
- LIN, C.H., CRAWFORD, B.F. & KOSMAN, D.J. 1993. Distribution of <sup>64</sup>Cu in *Saccharomyces cerevisiae*: kinetic analyses of partitioning. *J.Gen. Microbiol.*139:1617-1626.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E. F. & SAMBROOK, J. 1982 Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA.
- MARCO, G.M., STALL, R.E. 1983. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. *Plant.Dis.* 67:779-781.
- MELLANO, M.A. & COOKSEY, D.A. 1988. Nucleotide sequence and organization of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv *tomato*. *J.Bacteriol.* 170:2879-2883.
- MELLANO, M.A. & COOKSEY, D.A. 1988b. Induction of copper resistance operon from *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* 170:4399-4401.
- MESSING, J. 1979. A multipurpose cloning system based on single strand DNA bacteriophage M13. *Recomb. DNA Tech. Bull.* 2:43.
- MILLS, S.D.; JASALAVICH, C.A. & COOKSEY, J.A. 1993. A two component regulatory system required for copper-inducible expression of the copper resistance operon of *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* 175:1656-1664.
- MINSAVAGE, G.V., DHLBECK, D., WHALEN, M.C., KEARNEY, B. BONAS, U. STASKAWICZ, B.J. & STALL, R.E. 1990. Gene for gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* - pepper interactions. *Mol. Plant-Microbe Interactions.* 3:41-47.
- MURRAY, N.E., BRAMMAR, W.J. & MURRAY, K. 1977. Lambdoid phages that simplify the recovery of *in vitro* recombinants. *Mol. Gen. Genet.* 150:53.

- NAIKI, N. & YAMAGATA, S. 1976 Isolation and some properties of copper-binding proteins found in a copper-resistant strain of yeast. *Plant and Cell Physiology* **17**:1281-1295.
- NIES, D. H. & SILVER, S. 1989. Plasmid determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **171**: 896-900.
- NIES, D.H. & SILVER, S. 1989b Metal ion uptake by a plasmid free metal-sensitive *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **171**:4073-4075.
- NIES, D.H. 1992. Resistance to cadmium, cobalt, zinc and nickel in microbes. *Plasmid*, **27**:17-28.
- NKONG, C. & BALLANCE, G.M. 1982. A sensitive colorimetric procedure for nitrogen determination in micro-Kjeldahl digests. *J. Agric. Food Chem.* **30**:416-420.
- PODLESEK, Z., HERZOG, B. & AMBROZIC, J. 1993. Inducible resistance to zinc ions in *Bacillus subtilis* 168. *FEMS Microbiol. Lett.*, **113**:201-204.
- RODRIGUES-NETO, J. SUGIMORI, M.H. E MALAVOLTA JR., V.A. 1984. Raças de *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* (Doidge) Dye, no Estado de São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, **51**:13-16.
- RONALD, P.C. & STASKAWICZ, B.J. 1988. The avirulence gene *avrB* from *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* encodes a 50Kd protein. *Mol. Plant Microbe Interact.* **1**:191-198.
- ROUCH, D., CAMAKARIS, J. LEE, B.T.O. & LUKE, R.K.J. 1985. Inducible plasmid mediated copper resistance in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **131**:939-943.
- ROWBURY, R.J. & HUSSAIN, N.H. 1992. Chromosomally-determined induced tolerance to copper in *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* **15**:160-163.

- 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.
- SEDLMEIER, R. & ALTENBUCHNER, J. 1992. Cloning and DNA sequence analysis of the mercury resistance genes of *Streptomyces lividans*. *Mol. Gen. Genet.* **236**: 76-85.
- SEQUEIRA, L. 1984 Plant bacterial interactions. In: Linskens A.F., Heslop- Harrison J.(eds), Encyclopedia of plants physiology, New Ser., Springer, Berlin, pp:187-211.
- SHAW, J.J.; SETTLES, L.G. & KADO, C.I. 1988. Transposon Tn 4431 mutagenesis of *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. Characterization of a non pathogenic mutant and cloning of a locus for pathogenity. *Mol. Plant Microbe Interact.* **1**:39-45.
- SIDDIQUI, R., SCHLEGEL, H.G. & MEYER, M. 1988. Inducible and constitutive expression of pMOL28-encoded nickel resistance in *Alcaligenes eutrophus* N9A. *J.Bacteriol.* **170**:4188-4193.
- SILVER S. 1992. *Plasmid* **27**:1-3.
- SILVER, SIMON & WALDERHAUG, M. 1992. Gene regulation of plasmid and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiol. rev.***56**:195-228.
- SILVERBERG, B.A., STOKES, P.M. & FERSTENBERG, L.B. 1976. Intranuclear complexes in a copper-tolerant green alga. *J. Cell Biol.* **69**:210-214.
- STALL, R.E. & THAYER, P.L. 1962. Streptomycin resistance of the bacterial spot pathogen and control with streptomycin. *Plant Dis. Rep.* **46**:389-392.
- 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.

- SWANSON, J., KEARNEY, B. DAHELBECK, D. & STASKAWICZ, B. 1988. Cloned avirulence gene of *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* complements race change mutants. *Mol.Plant-Microbe Interactions* 1: 5-9.
- SUNDIN,G.W., JONES, A.L. & FULBRIGHT, D.W. 1989. Copper resistance in *pseudomonas syringae* pv *syringae* from cherry orchards and its associated transfer in vitro and in planta with a plasmid. *Phytopathology* 79:861-865.
- TURNER, P., BARBER, C. & DANIELS, M. 1985. Evidence for clustered pathogenicity genes in *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. *Mol. Gen. Genet.*,199:338-343.
- VAUTERIN, L., SWINGS, J., KESTERS, K., GILLIS, M., MEW, T.W., SCHROTH, M.N., PALLERON, N.J., HILDEBRAN, D.C., STEAD, D.E., CIVEROLO, E.L., HAYWARD, A.C., MARAITE, H., STALL, R.E., VIDAVER, A.K. & BRADBURY, J.F. 1990. Towards an improvement taxonomy of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*40:312-316.
- VAUTERIN, L., SWINGS, J. & KERSTERS,K. 1991. Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars by SDS-PAGE of proteins. *Journal of Gen. Microbiol.* 137:1677-1687.
- VOLOUDAKIS, A.E., BENDER,C.L. & COOKSEY,D.A. 1993. Similarity between cooper resistance genes from *Xanthomonas campestris* and *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.*59:1627-1634.
- WEISS, A.A., MURPHY, S.D. & SILVER,S. 1977. Mercury and organomercurial resitances determined by plasmids in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol* 132:197-208.
- WHITE,T.J. & GONZALEZ, C.F. 1991. Application of eletroporation for efficient transformation of *Xanthomonas campestris* pv *oryzae*. *Phytophatology* 81:521-524.

YOUNG, R.A. & DAVIS, R.W. 1983. Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**:1194.