

BC/22598
IB/80982

80982



**ISOLAMENTO E ANÁLISE DO CLONE pMV08
ENVOLVIDO COM A BIOSÍNTESE DO
EXOPOLISSACARÍDEO DE *Xanthomonas campestris***

SUZETE APARECIDA LANZA DESTEFANO

ORIENTADOR: PROF^a. DR^a. YOKO BOMURA ROSATO

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
SUZETE AP. LANZA DESTEFANO

e aprovada pela Comissão Julgadora.

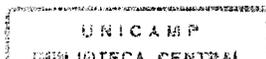
Tese apresentada ao Departamento
de Genética e Evolução da
Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título
de Doutor em Genética.

CAMPINAS - SÃO PAULO

1994

T/UNICAMP

D473_i



UNIDADE	IB
N.º UNIDADE:	TI UNICAMP
	D4732
V.	E.
TOMO	01/22598
PREC	286/94
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	08/10/94
N.º CPD	

em-00063100-9

Dedico e ofereço esta tese,
ao meu marido Ricardo e aos
meus filhos Ricardo e Guilherme.

AGRADECIMENTOS

Aos professores:

Dr^a. Aline Pizzirani-Kleiner pela atenção, leitura e sugestões deste trabalho.

Dr^a. Elisabeth José Vicente pela atenção dispensada, leitura e sugestões deste trabalho.

Dr. Adilson Leite, pelas inúmeras sugestões e conselhos.

Dr. Vanderlei Perez Canhos, pela leitura e avaliação deste trabalho.

Dr. Wanderley Dias da Silveira, pela leitura e avaliação deste trabalho

Dr^a. Laura Ottoboni pela amizade e conselhos durante todos esses anos.

Às incomparáveis secretárias Sandrinha e Tânia do CBMEG pela competência e disposição, além do carinho dispensado.

À Silvia e Tereza, secretárias do Departamento de Genética, atenção e eficiência que permitiram o encaminhamento deste trabalho em tempo hábil.

À Sandrinha e Wilson, pela colaboração e auxílio técnico nos experimentos.

Ao pessoal do laboratório de Genética Humana pelo apoio.

Ao CNPq, FAEP e meu marido Ricardo pelo apoio financeiro.

Aos amigos:

André, Germano, Gonçalo, Marymar pela agradável convivência e colaboração.

Andrés, pela amizade, disponibilidade e incalculável auxílio na análise da sequência de DNA.

Silvia e Tereza pela convivência, amizade e incentivo nas horas difíceis.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Dr^a Yoko minha orientadora, pela amizade, confiança, incentivo, apoio e compreensão durante esses anos todos.

A todo o pessoal do laboratório: Edmilson (Edinho), Georgia (Giu), Valéria Maia (Lerinha), Valéria Batista, Ângela e Lyriam pela agradável convivência e amizade.

À querida amiga Regina (Rê), pelo companheirismo, amizade, apoio nas horas difíceis, conselhos, auxílio prático e incalculável auxílio na redação desta tese.

À Rosângela (Rôsinha) pela amizade, convivência, apoio e incalculável auxílio na confecção das fotos deste trabalho.

À Nair Lídia pela amizade e convivência nesses anos todos.

À Maria Elena pela amizade, apoio e conselhos em todos os momentos.

À Berenice (Berê) pela amizade, apoio e prestatez.

E aos meus pais, pela compreensão e apoio.

ABREVIACOES

Abs	absorbância
DDBJ	DNA Data Bank of Japan
EDTA	cido etilenodiamino-tetracético
EMBL	European Molecular Biology Laboratories
GenBank	Genetic Sequence Data Bank
IPTG	isopropil tio- β -D-galactosídeo
Km	kanamicina
kb	kilobases
Nal	cido nalidíxico
pb	pares de bases
q. s. p.	quantidade suficiente para
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
Sm	estreptomicina
Sp	espectinomicina
μ g	microgramas
μ l	microltros

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Biossíntese de Exopolissacarídeos.....	5
2.2. Genética da Biossíntese de EPS.....	8
2.3. Regulação da Produção de EPS.....	11
2.4. Relação EPS/Patogenicidade.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Linhagens Bacterianas e Plasmídios.....	17
3.2. Meios de Cultura.....	23
3.2.1. Meio de cultura para <i>Xanthomonas campestris</i>	23
3.2.2. Meio de Fermentação.....	23
3.2.3. Meio de cultura para <i>Escherichia coli</i>	24
3.2.4. Antibióticos.....	25
3.2.5. Meios de Detecção de Enzimas Extracelulares.....	25
A) Meio para detecção de atividade proteolítica.....	25
B) Meio para detecção de atividade amilolítica.....	25
C) Meio para detecção de atividade lipolítica.....	26
D) Meio para detecção de atividade celulolítica.....	26
E) Meio para detecção de atividade pectolítica.....	27

	Página
3.3. Conjugação.....	28
3.4. Extração de Plasmídios.....	29
3.5. Ligação Inseto/Vetor.....	29
3.6. Transformação.....	29
3.7. Fermentação.....	30
3.8. Teste de Fitopatogenicidade.....	30
3.9. Curva de Crescimento.....	31
3.10. Vetor para Subclonagem dos Fragmentos obtidos.....	32
3.11. Gel de Sequenciamento.....	34
3.11.1. Tratamento das Placas.....	34
3.11.2. Montagem das Placas.....	34
3.11.3. Preparo do Gel.....	35
3.12. Sequenciamento.....	36
3.13. Deleção Unidirecional com a enzima exonuclease III.....	37
3.14 Southern Blotting e Hibridização não radioativa.....	40
A) Transferência Alcalina.....	40
B) Soluções e Tampões Utilizados.....	40
C) Marcação do Fragmento (sonda).....	41
D) Hibridização e Lavagens.....	41
E) Detecção da sonda com AMPPD.....	42
3.15. Subclonagens.....	43
3.16. Eletrotransformação.....	44

	Página
4. RESULTADOS.....	45
4.1. Isolamento dos Clones de EPS.....	45
4.2. Caracterização dos Clones Obtidos.....	47
4.2.1. Fermentação.....	47
4.2.2. Testes de Fitopatogenicidade.....	50
4.2.3. Curva de Crescimento.....	53
4.2.4. Produção de Enzimas Extracelulares.....	56
4.3. Transferência do pMV04 e pMV08 para Outras Linhagens de <i>X.campestris</i> ..	57
4.3.1. Fermentação das Linhagens Resistentes ao Ácido Nalidíxico em NYGB	62
4.4. Efeito do Plasmídeo pMV08 em Linhagens com Outros Marcadores Genéticos	64
4.4.1. Teste de Fitopatogenicidade.....	66
4.4.2. Produção de Enzimas Extracelulares.....	66
4.5. Subclonagens do pMV08.....	69
4.5.1. Obtenção e Caracterização dos Subclones.....	69
4.6. Sequenciamento.....	72
4.6.1. Deleção Unidirecional do Clone pKS08.....	72
4.6.2. Análise da Sequência do pKS08.....	74
5.DISSCUSSÃO.....	80
5.1. Isolamento e Caracterização dos Clones de EPS.....	80
5.2. Análise da Sequência do pKS08.....	84

	Página
6. CONCLUSÕES.....	85
7. RESUMO.....	86
8. SUMMARY.....	89
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
APÊNDICE I.....	107
APÊNDICE II.....	108
APÊNDICE III.....	111
APÊNDICE IV.....	114
APÊNDICE V.....	115

1.INTRODUÇÃO

Xanthomonas campestris é uma bactéria Gram-negativa de dupla importância econômica. É responsável por doenças em diversas espécies vegetais como: couve, feijão, mandioca, algodão, laranja, etc. (Williams, 1980) e é produtora da goma xantana, um exopolissacarídeo (EPS) importante comercialmente (Paul *et al.*, 1986). Este EPS apresenta propriedades interessantes industrialmente: é estável a alterações de pH, temperatura e a altas concentrações de sais e produz alta viscosidade a baixas concentrações (Jeanes *et al.*, 1961).

A xantana é o primeiro polissacarídeo, de origem microbiana, de importância comercial. Sua estrutura é um pentassacarídeo com esqueleto de glicose e ramificações de manose e ácido glucurônico. Em adição, radicais de acetato e piruvato presentes na sua estrutura podem alterar o fator viscosidade (Cadmus *et al.*, 1976; Sandford & Baird, 1983).

Nos Estados Unidos, a partir de 1961 a xantana passou a ser produzida comercialmente e em 1969 ela foi aprovada para o uso na alimentação humana. Na área alimentícia a goma xantana pode ser adicionada a conservas, laticínios, produtos de panificação, alimentos congelados, sorvetes e molhos. Pode ser utilizada também como agente suspensivo em bebidas preparadas com suco de frutas (Cottrell, 1979).

Na área industrial a xantana é utilizada na formulação de pesticidas, abrasivos, polidores, cerâmica, pigmentos, produtos farmacêuticos, corantes e também como espessante de pastas de impressão de têxteis (Sandford, 1979).

Devido à sua estabilidade ao pH e pseudoplasticidade, é sugerida sua aplicação na recuperação de óleos, onde o crescimento da bactéria na superfície dos poros das rochas desaloja o óleo por deslocamento físico, aumentando assim a produção (Sandvik e Maerker, 1977) e na perfuração de poços de petróleo, aumentando a viscosidade da água e desviando fluidos do reservatório para áreas não alcançadas (Wells, 1977).

Há vários relatos sobre a biossíntese da xantana e sua estrutura química já é bem conhecida (Horton *et al.*, 1985; Ielpi e Dankert, 1981a e 1981b; Melton *et al.*, 1976). Esses trabalhos revelam que o processo de biossíntese dessa goma é muito similar ao processo de biossíntese de exopolissacarídeos de outras bactérias Gram-negativas .

A função do exopolissacarídeo (EPS), na natureza, ainda não está clara, mas acredita-se que este seja um fator importante no processo de patogênese e na interação planta-patógeno (Costerton *et al.*, 1987; Whitfield *et al.*, 1981; Leigh & Coplin, 1992).

Em *Xanthomonas campestris* ainda não se estabeleceu, definitivamente, uma ligação direta entre produção de EPS e patogenicidade, apesar de ter sido detectada uma correlação positiva entre morfologia de colônia e patogenicidade (Whitfield *et al.*, 1981; Sutton e Williams, 1970; Ramirez *et al.*, 1988)

O uso de técnicas de biologia molecular permitiu a identificação de genes envolvidos com a produção de goma xantana e há evidências de que vários *loci* genéticos estão envolvidos na biossíntese da goma (Barrère *et al.*, 1986; Thorne *et al.*, 1987; Harding *et al.*, 1987; Hotte *et al.*, 1990; Koplín *et al.*, 1992).

Apesar de alguns genes envolvidos com a biossíntese da goma xantana já serem conhecidos, a literatura sobre construção e/ou obtenção de linhagens melhoradas é bastante escassa ou mesmo nula. Tentativas preliminares efetuadas por Destefano & Rosato (1991), usando mutagênese com o transposon Tn5, produziram mutantes com produção de goma com características alteradas, entretanto, o nível de produção se manteve semelhante ao da linhagem original. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi identificar determinantes genéticos envolvidos com a biossíntese da goma xantana e

verificar seu efeito em outras linhagens/patovares de *X.campestris*.

Com a finalidade de obter linhagens com melhor produção de goma xantana, esses determinantes foram introduzidos em linhagens com boa produção e foram analisados os efeitos dessa inserção. Alternativamente, esses determinantes foram, também, introduzidos em linhagens/patovares com baixa produção de goma.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As bactérias fitopatogênicas gram-negativas dividem-se em quatro gêneros: *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*.

O gênero *Xanthomonas*, segundo Van den Mooter *et al.* (1987), consiste de oito espécies: *X.albilineans*, *X.graminis*, *X.axonopodis*, *X.fragariae*, *X.maltophilia*, *X.oryzae*, *X.populi* e *X.campestris*. As bactérias deste gênero apresentam-se em forma de bastonetes, com colônias de coloração amarelada devido ao pigmento xantomonadina, exclusivo do gênero, possuem flagelo polar que lhes permite a motilidade, são estritamente aeróbicas, a maioria de crescimento lento e são encontradas apenas em associação com plantas ou material vegetal (Leyns *et al.*, 1984; Agrios, 1989). Causam doenças em pelo menos 124 espécies de monocotiledôneas e 268 espécies de dicotiledôneas, através de lesões necróticas em folhas, caules e frutos, murchas, maceração de tecidos e hiperplasias (Leyns *et al.*, 1984).

A espécie *X.campestris* foi dividida em 125 patovares (Bradbury *et al.*, 1984) os quais foram determinados após a infecção no hospedeiro do qual a bactéria foi isolada. Recentemente foi proposta uma nova classificação em 143 patovares (Young *et al.*, 1992).

2.1. BIOSÍNTESE DE EXOPOLISSACARÍDEOS

A produção de polissacarídeos extracelulares (EPSs) é muito comum em muitos gêneros de bactérias. Esses EPSs podem formar uma cápsula ao redor da célula ou podem ser excretados para o meio ambiente como um muco (Coplin e Cook, 1990). Segundo Ferris e Beveridge (1985), os EPSs possuem duas propriedades que ajudam a determinar suas funções: 1) os polissacarídeos capsulares são altamente hidratados e portanto protegem a bactéria de dessecação e evitam que moléculas hidrofóbicas penetrem na cápsula e cheguem à membrana celular. Assim, bactérias com cápsula são mais resistentes à ação de detergentes e antibióticos hidrofóbicos. 2) Os EPSs ácidos produzidos pela maioria das bactérias fitopatogênicas são altamente aniônicos e assim, podem atuar como resinas de troca iônica, concentrando minerais e nutrientes ao redor da célula, ou podem ligar-se a elementos tóxicos (Norberg e Persson, 1984). Outra função importante do polissacarídeo capsular, no solo ou em ambiente aquático, é que este ajuda na adesão da bactéria a superfícies biológicas ou inertes, nas quais existem altas concentrações de nutrientes (Norkrans, 1980; Ramphal e Pier, 1985; Marcus e Baker, 1985). Como muitas bactérias fitopatogênicas precisam crescer ou sobreviver no solo ou em folhas ou raízes de plantas para completar seu ciclo de vida, a proteção contra o meio ambiente hostil seria um motivo para que a bactéria passasse a produzir EPS. Há relatos que o exopolissacarídeo é o fator mais importante para a patogenicidade e virulência. Em *Agrobacterium tumefaciens*, verificou-se que o EPS tem papel fundamental na ligação e infecção (Kamoun *et al.*, 1989) e isto também foi verificado em espécies de *Rhizobium* por Chen *et al.* (1988), Djordjevic *et al.* (1987) e Leigh *et al.* (1985).

Segundo Bradshaw-Rouse *et al.* (1981) e Romeiro *et al.* (1981) as cápsulas e a goma podem atuar como barreiras às respostas de defesa do hospedeiro. Em folhas, a goma bacteriana formada nos espaços intercelulares pode reter água e nutrientes e

portanto contribuir para o sintoma de entumescimento e criar um ambiente favorável ao crescimento bacteriano (Coplin e Majerczak, 1990).

Os EPSs podem ser homopolímeros ou heteropolímeros e ainda podem carregar uma certa variedade de radicais. Os homopolímeros incluem glucanas, levanas e alginatos; os heteropolímeros são polímeros ácidos compostos de arranjos lineares de unidades repetitivas de açúcares neutros, ácido glucurônico e radicais de acetato, piruvato, hidroxibutirato e succinato (Sutherland, 1988; Whitfield *et al.*, 1981).

O exopolissacarídeo mais simples de bactérias fitopatogênicas é a levana, que é encontrado em várias espécies de *Pseudomonas* (Fett *et al.*, 1989) e *Erwinia amylovora* (Bennett e Belling, 1980). Ela é sintetizada extracelularmente a partir de sacarose pela enzima levansucrase (Gross e Rudolph, 1987).

As glucanas são exopolissacarídeos produzidos por algumas bactérias Gram-positivas (Stoddard, 1984) e os alginatos são produzidos por algumas espécies de *Pseudomonas* (Fett *et al.*, 1989; Ohman, 1986).

O processo utilizado para a produção desses polissacarídeos envolve poucas enzimas, além daquelas necessárias para a síntese do açúcar nucleotídeo precursor. Entretanto, a estrutura e a síntese de heteropolissacarídeos produzidos por bactérias entéricas e *Xanthomonas* são muito mais complexas.

Grande parte dos relatos sobre a síntese de heteropolissacarídeos vem de estudos de *Klebsiella aerogenes* (Troy, 1979), *Xanthomonas campestris* (Ielpi *et al.*, 1981a e 1981b) e por analogia a estudos similares de síntese de lipopolissacarídeos em *Salmonella typhimurium* e produção de ácido siálico em *Escherichia coli* (Troy, 1979; Vimr *et al.*, 1989).

Há várias revisões sobre a síntese desses polissacarídeos (Boulnois e Jann, 1989; Jann e Jann, 1991; Sutherland, 1977 e 1988; Troy, 1979) e verificou-se que este processo envolve quatro estágios: 1) síntese de um intermediário difosfatado de açúcar nucleotídico, 2) processo de reunião das subunidades oligossacarídes repetitivas do

polímero por transferência dos monossacarídeos do correspondente açúcar nucleotídico para um lipídeo carreador localizado na membrana da célula, 3) adição de radicais tais como piruvato, acetato succinato, hidroxibutirato e sulfato, 4) transferência da cadeia polissacarídica em crescimento do seu lipídeo carreador para a nova subunidade. Pouco se conhece sobre o mecanismo de polimerização mas acredita-se que ele ocorra na face interna da membrana citoplasmática e posteriormente o EPS é transportado para a superfície da célula através das zonas de adesão entre as membranas externa e interna (Kroncke *et al.*, 1990). Portanto, a síntese de EPS requer enzimas para a produção de cada açúcar nucleotídeo precursor, transferases para cada monossacarídeo na subunidade, uma ou mais polimerases e proteínas que estariam envolvidas no transporte do polissacarídeo.

A biossíntese de goma xantana, um pentassacarídeo, já foi bem caracterizada por Ielpi *et al.* (1981a e 1981b). Eles propuseram um modelo no qual a subunidade oligopolissacáride ou pentamérica está unida ao lipídeo carreador na seguinte ordem: glicose (Glu), glicose (Glu), manose (Man), ácido glicurônico (GlcA) e manose (Man). As adições são efetuadas por glicosiltransferases de I a V, respectivamente e os radicais piruvato são adicionados por cetolases e acetato por acetilases.

2.2. GENÉTICA DA BIOSÍNTESE DE EPS

Os genes da biossíntese de EPS têm sido isolados e analisados em diversas espécies de bactérias fitopatogênicas.

Em *Erwinia stewartii*, Dolph *et al.* (1988), através de um banco genômico, obtiveram um plasmídeo recombinante (pES2144) que restaurou a produção de EPS em 14 mutantes espontâneos deficientes para a síntese do polissacarídeo capsular (*cps*). Através de subclonagens, análise de restrição, mutagênese com transposon Tn5, Tn5*lac* e deleções, eles localizaram cinco regiões envolvidas na produção de polissacarídeo capsular (*cps*) e que foram denominadas *cpsA-cpsE*. Foi verificado também, que os mutantes *cps*⁻ não foram capazes de causar doença em plantas e que mutações nos genes *cpsB* a *cpsE* aboliram completamente a habilidade da bactéria de causar lesões em plântulas.

Ainda trabalhando com esses mesmos genes, Coplin e Majerczak (1990) analisaram um "cluster" de genes requeridos para a síntese do exopolissacarídeo (*cps*) através de mutagênese com transposons e verificaram que este "cluster" contém, pelo menos, cinco grupos de complementação. Observaram também que linhagens de *Erwinia stewartii* com mutações nos genes *cpsA* e *cpsB* mostraram redução no poder de infecção em plântulas enquanto que mutantes *cpsC* e *cpsE* eram avirulentos.

Em *Pseudomonas solanacearum*, Cook e Sequeira (1991) utilizando mutagênese com o transposon Tn3, identificaram um "cluster" que contém cinco grupos de complementação que são necessários para a síntese de EPS nesta bactéria. Os autores encontraram, também, uma correlação positiva entre produção de EPS e virulência.

O melhor modelo para a síntese de EPS é o de goma xantana pois é um dos poucos sistemas no qual alguns genes biossintéticos e seus produtos enzimáticos já foram descritos.

Harding *et al.* (1987) clonaram vários genes essenciais para a produção de goma xantana em mutantes não mucóides e isolaram um plasmídio contendo um fragmento de 12,4kb que possui um "cluster" de, pelo menos, quatro genes ligados que estão envolvidos na biossíntese de goma xantana. A introdução deste plasmídio na linhagem selvagem NRRL-B1459 de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, que produz a xantana utilizada comercialmente, aumentou em 10% a produção da goma e em 45% a piruvatação da cadeia.

Thorne *et al.* (1987) identificaram, nessa mesma linhagem, três *loci*, não ligados, com genes para a biossíntese de xantana. Linhagens do tipo selvagem carregando cópias múltiplas do plasmídio contendo esses genes aumentaram a produção de goma em 20%, havendo casos em que a produção dobrou.

Hötte *et al.* (1990) identificaram, através de mutagênese com o Tn5, doze grupos de complementação relacionados com a produção de EPS. As funções desses genes, os quais acredita-se serem diferentes dos descritos até o momento, ainda são desconhecidas. Mutações neste grupo de genes afetam outras propriedades de superfície da bactéria de forma que eles podem sintetizar os açúcares nucleotídicos.

Marzocca *et al.* (1991), através de caracterização bioquímica e estudos de complementação de um mutante de *Xanthomonas campestris* que produz goma sem radicais piruvato, identificaram o gene que codifica a enzima cetal piruvato transferase, responsável pela piruvatação da cadeia de goma xantana, entretanto os autores não conseguiram determinar se a piruvatação está relacionada com a razão de síntese de EPS.

A região inteira que codifica para a síntese de EPS da linhagem NRRL-B1459 foi sequenciada e os produtos das proteínas, determinados (*in* Leigh e Coplin, 1992). Doze fases para leitura (ORF- Open Reading Frame) foram determinadas e designadas de *gumB* a *gumM*. Análises da sequência e mapeamento revelaram somente uma região promotora e nenhum sinal interno de terminação, sugerindo que esta região é um grande operon.

Koplin *et al.* (1992) analisaram a sequência nucleotídica de um fragmento de 3,4kb

de *X.c.pv.campestris* e verificaram duas regiões abertas de leitura (ORFs) que foram designadas *xanA* e *xanB*, e que estão relacionadas com biossíntese de goma xantana. O gene *xanA* codifica uma enzima ou um fator regulatório necessário para a biossíntese de glucose 1-fosfato e manose 1-fosfato e o gene *xanB* codifica uma enzima bifuncional que possui atividades de fosfomanose isomerase e GDP-manose pirofosforilase. Essas enzimas estão envolvidas na biossíntese de GDP-manose, que é um precursor imediato da goma xantana.

Grupos de genes da biossíntese de EPS já foram relatados em *Escherichia coli* K12 (Trisler e Gottesman, 1984), na espécie de *Rhizobium* NGR234 (Chen *et al.*, 1988), em *Rhizobium meliloti* (Glazebrook e Walker, 1989; Leigh *et al.*, 1985).

2.3. REGULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EPS

A regulação da síntese de EPS em bactérias fitopatogênicas é muito complexa e envolve tanto o sistema de regulação positiva quanto a negativa. Em *Xanthomonas campestris* e *Pseudomonas solanacearum*, o EPS pode ser regulado separadamente ou como parte de um regulon de patogenicidade que inclui várias enzimas extracelulares, tais como proteases e celulases, envolvidas no processo de patogênese (Leigh e Coplin, 1992).

Em *Erwinia amylovora* e *E.stewartii* não há produção de enzimas extracelulares relacionadas com o fator patogenicidade e o EPS é regulado por um mecanismo semelhante ao de bactérias entéricas (*in* Leigh e Coplin, 1992).

Torres-Cabassa *et al.* (1987), através de fusões do operon *lacZ* no gene de síntese de polissacarídeo capsular (*cps*) verificaram que os genes *cpsA-cpsD* em *E.stewartii* estão sob uma regulação positiva pelo produto do gene *rcsA*. Quando este gene foi clonado e sequenciado verificou-se que ele funciona em *E.coli* e possui alta homologia com as sequências de aminoácidos do gene *rcsA* (gene regulador positivo) de *E.coli*. (Coplin e Cook, 1990). Análise da sequência nucleotídica do gene *rcsB* de *E. stewartii* revelou uma região aberta para leitura (ORF) que possui 90% de homologia com os aminoácidos da proteína RcsB de *E.coli*. O sequenciamento parcial da região adjacente ao *rcsB* revelou alta homologia com o *rcsC* de *E.coli* (Leigh e Coplin, 1992).

A regulação do EPS de espécies de *Erwinia* foi baseada a partir do modelo proposto para a síntese de ácido colônico em *Escherichia coli* (Gottesman e Stout, 1991) onde a expressão do gene do polissacarídeo capsular é regulado positivamente pelo produto do gene *rcsA*, o qual é rapidamente degradado por uma protease. Um controle adicional é realizado por outro componente regulatório que consiste de um efector, *rcsB* e um sensor, *rcsC* (Gottesman *et al.*, 1985, Brill *et al.*, 1988; Stout e Gottesman, 1990). O

locus *rscBC* já foi sequenciado e é homólogo a outros componentes regulatórios já descritos. Por analogia o RcsC pode ser uma fosforilase/kinase que ativa RcsB que por sua vez, ativa a transcrição do polissacarídeo capsular. A proteína RcsB pode também atuar com a RcsA, estimulando a expressão de polissacarídeo por um mecanismo ainda não conhecido (Coplin e Cook, 1990). Os dados sugerem, portanto, que a síntese de EPS em *E.stewartii* deve estar sob o controle de um sistema regulatório como o RcsB e RcsC, de um do tipo RcsA e de uma protease.

Em *Pseudomonas solanacearum*, mutantes deficientes para a produção de EPS também apresentam outras características afetadas, tais como decréscimo na produção de endoglucanase, aumento de síntese de poligalacturonato liase, produção de indol-3-ácido acético, pigmentação e motilidade (Buddenhagen e Kelman, 1964; Morales *et al.*, 1985). Brumbley e Denny (1990) denominaram este efeito pleiotrópico de conversão de fenótipo (PC). Por muito tempo pensou-se que este evento não poderia ter surgido de uma mutação simples, pois a reversão ao fenótipo selvagem nunca foi observada; entretanto verificou-se que um ou mais rearranjo genético aparentemente pode levar ao fenótipo PC, onde vários fatores poderiam estar envolvidos. Em adição, Huang *et al.* (1989) observaram que a inativação do gene regulatório positivo *phcA* resulta no fenótipo PC, ocorrendo um decréscimo na transcrição do gene *eps* e do gene de endoglucanase. Brumbley e Denny (1990) também verificaram este fato através de mutantes espontâneos PC que apresentavam uma mutação no gene regulatório positivo *phcA*.

Os principais resultados de regulação gênica em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* foram apresentados pelo grupo de M.J.Daniels na Inglaterra e estes sugerem que há pelo menos dois controles regulatórios positivos e um negativo na síntese de goma xantana. Daniels *et al.* (1989) isolaram um mutante não patogênico que era deficiente na produção de enzimas extracelulares como protease e poligalacturonato liase e que também apresentava redução nos níveis de amilase, endoglucanase e de síntese de EPS. A clonagem e análise genética deste locus revelou um grupo de sete genes

regulatórios positivos (*rpfA-F*, regulation of pathogenicity factors) que apresentavam efeito coordenado nas quatro enzimas de degradação citadas acima, EPS e patogenicidade. A sequência de *rpfC* mostrou forte homologia com domínios conservados de proteínas sensora e efetora de sistemas regulatórios procarióticos de dois componentes como RcsC e RcsB de *Erwinia* (Tang *et al.*, 1991).

Entretanto este sistema (Rpf) parece estar balanceado, em paralelo, por uma regulação do tipo negativa. Tang *et al.*(1990) clonaram um *locus* que, quando presente num plasmídio multicópia, causava diminuição dos níveis de enzimas extracelulares e síntese de EPS. A inativação deste *locus* produziu uma linhagem patogênica e causou um aumento nos níveis de enzimas degradativas e polissacarídeo.

2.4. RELAÇÃO EPS/PATOGENICIDADE

Segundo relatos de literatura o EPS de bactérias tem dois papéis importantes no desenvolvimento de doenças: ele pode causar murchamento ou definhamento de plantas através do bloqueio do xilema e é parcialmente responsável pelo sintoma de encharcamento em folhas. O EPS também pode contribuir ajudando a bactéria a se movimentar pelos tecidos da planta, promovendo seu crescimento em espaços intercelulares e protegendo a bactéria de elementos de defesa da planta.

Há muita controvérsia acerca do papel dos exopolissacarídeos na patogenicidade. Já foi verificado que mutações em EPS de espécies de *Rhizobium* levam a uma redução na habilidade de nodulação em plantas hospedeiras (Djordjevic *et al.*, 1987; Leigh *et al.*, 1985; Leigh e Lee, 1988).

Em *Erwinia stewartii*, Dolph e Coplin (1988) relataram que nenhum mutante para a síntese de EPS (*cps*⁻) foi capaz de causar o definhamento sistêmico em plantas de milho. Coplin e Majerczak (1990), analisando um "cluster" de cinco genes relacionados com a síntese de EPS e designados de *cpsA* a *cpsE* verificaram que mutações nos genes *cpsA*, *cpsB* e em alguns casos *cpsD* acarretavam lesões necróticas limitadas em plântulas de milho e que mutações nos genes *cpsC* e *cpsE* resultavam em perda total do poder de virulência.

A maioria dos trabalhos relacionados com EPS e virulência de *Pseudomonas solanacearum* estão baseados em mutantes espontâneos EPS⁻. Denny *et al.* (1988) obtiveram mutantes de *P. solanacearum*, através de mutagênese com o transposon Tn5 com dois tipos de morfologia de colônia diferentes: um não produzia EPS (EPS⁻) e portanto as colônias eram totalmente secas e o outro produzia um EPS residual (EPSⁱ), com colônias relativamente secas. A análise de virulência desses mutantes revelou que esta estava afetada em diferentes níveis em ambos os tipos de mutantes.

Portanto, há evidências de que o EPS é um fator importante para a virulência de *P.solanacearum*, entretanto Xu *et al.* (1990) obtiveram mutantes EPS⁻ desta mesma bactéria, através de mutagênese com Tn5, que mantiveram os níveis de virulência muito próximos ao do tipo selvagem.

Com o objetivo de analisar com mais detalhes os genes requeridos para produção de EPS e virulência Cook e Sequeira (1991), em estudos com *Pseudomonas solanacearum*, verificaram que existe uma correlação positiva entre quantidade de EPS produzido na cultura, na planta e virulência. Todos os mutantes que possuíam morfologia de colônia afetada tinham também a virulência afetada.

Kao e Sequeira (1991) também trabalhando com *P.solanacearum*, verificaram que um dos grupos de genes envolvidos na biossíntese de EPS também é requerido para a biossíntese de lipopolissacárides (LPS), que segundo relatos de literatura têm papel importante na virulência deste organismo. Mutações neste grupo de genes decresceram os níveis de produção de EPS, impediram a ligação de um fago específico de LPS e alteraram a motilidade do LPS purificado em géis de poliacrilamida e quando a biossíntese de LPS foi restaurada, isto não foi suficiente para restaurar a virulência ao nível do tipo selvagem, sugerindo que o EPS é um fator importante para o processo de patogênese.

Kao *et al.* (1992) confirmaram esta hipótese através do estudo de mutantes EPS⁻ utilizando uma série de concentrações de inóculos. Os autores verificaram que tanto os mutantes não produtores de EPS e os mutantes defectivos apresentavam redução no poder de infecção com relação ao tipo selvagem.

Com relação a *Xanthomonas campestris*, Barrère *et al.* (1986), clonando genes envolvidos com a produção do polissacarídeo xantana, verificaram que mutantes deficientes para o EPS mantiveram a patogenicidade. Porém os autores não puderam concluir se, realmente, o EPS está relacionado com a virulência desta bactéria.

Posteriormente, Ramírez *et al.* (1988) tentaram correlacionar tamanho de colônia, produção de goma e virulência e verificaram que não há uma correlação clara entre tamanho de colônia/virulência e produção de goma xantana/virulência. Entretanto os autores sugerem que os danos nas plantas são causados, principalmente, pelo poder viscosificante da goma, mais do que pela sua quantidade.

Daniels *et al.* (1989) verificaram que mutantes para a produção de xantana de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* eram virulentos quando inoculados por infiltração ou lesão, mas que pareciam fracamente virulentos quando introduzidos através dos estômatos (ponto de penetração natural).

Xu *et al.* (1990), trabalhando com *Pseudomonas solanacearum*, observaram que mutantes EPS⁻ altamente virulentos, chegaram a produzir 20% da quantidade normal de EPS com relação à linhagem selvagem. Denny e Baek (1991) verificaram que mutantes dessa mesma bactéria que pareciam ser não mucóides, em meio de cultura rico em nutrientes, eram virulentos e ainda produziam EPS na planta.

Portanto, a relação EPS/patogenicidade envolve ainda muita controvérsia e muitos estudos deverão ser realizados para elucidar esta questão.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. LINHAGENS BACTERIANAS E PLASMÍDIOS

As linhagens bacterianas e os plasmídios utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 1 e Tabela 2, respectivamente.

Tabela 1 - Linhagens bacterianas

Linhagens	Características	Fonte ou referência
<i>Xanthomonas campestris</i> <i>pv. vesicatoria</i>	patógeno de tomate e/ou pimentão	
317	tipo selvagem	Instituto Biológico de Campinas - (I.B.)
411	tipo selvagem	Instituto Biológico de Campinas - (I.B.)
411NaI ^r	mutante espontâneo resistente ao ácido nalidíxico, derivado da linhagem 411	Laboratório Genética de Microrganismos (UNICAMP)
411NaI ^r [pMV04]	411NaI ^r contendo o plasmídeo pMV04 (com inserto de 2,5kb)	Este trabalho
411NaI ^r [pMV08]	411NaI ^r contendo o plasmídeo pMV08 (com inserto de 3,9kb)	Este trabalho
411Sm ^r	mutante espontâneo resistente à estreptomicina, derivado da linhagem 411	Laboratório Genética de Microrganismos (UNICAMP)
411Sm ^r [pMV08]	411Sm ^r contendo o plasmídeo pMV08	Este trabalho
411Sp ^r	mutante espontâneo resistente à espectinomicina, derivado da linhagem 411	Laboratório Genética de Microrganismos (UNICAMP)
411Sp ^r [pMV08]	411Sp ^r contendo o plasmídeo pMV08	Este trabalho
420NaI ^r	mutante espontâneo resistente ao ácido nalidíxico, derivado da linhagem 420	Laboratório Genética de Microrganismos (UNICAMP)
420NaI ^r [pMV04]	420NaI ^r contendo o plasmídeo pMV04	Este trabalho
420NaI ^r [pMV08]	420NaI ^r contendo o plasmídeo pMV08	Este trabalho

Tabela 1: Continuação

Linhasgens	Características	Fonte ou referência
479 NaI ^r	mutante espontâneo resistente ao ácido nalidíxico derivado da linhagem 479	Laboratório Genética de Microrganismos (UNICAMP)
479NaI ^r [pMV04]	479NaI ^r contendo o plasmídeo pMV04	Este trabalho
479NaI ^r [pMV08]	479NaI ^r contendo o plasmídeo pMV08	Este trabalho
<i>pv.campestris</i>	patógeno de crucíferas	
Ca110	tipo selvagem	Fund. "André Tosello"
Ca110[pMV04]	Ca110 contendo o plasmídeo pMV04	Este trabalho
Ca110[pMV08]	Ca110 contendo o plasmídeo pMV08	Este trabalho
Ca110NaI ^r	mutante espontâneo resistente ao ácido nalidíxico, derivado da linhagem Ca110	Laboratório Genética de Microrganismos (UNICAMP)
Ca110NaI ^r [pMV04]	Ca110NaI ^r contendo o plasmídeo pMV04	Este trabalho
Ca110NaI ^r [pMV08]	Ca110NaI ^r contendo o plasmídeo pMV08	Este trabalho
Sm ^r	mutante espontâneo resistente à estreptomicina, derivado da linhagem Ca110	Destefano & Rosato, 1991
Sm ^r [pMV04]	Sm ^r contendo o plasmídeo pMV04	Este trabalho
Sm ^r [pMV08]	Sm ^r contendo o plasmídeo pMV08	Este trabalho

Tabela 1: Continuação

Linhagens	Características	Fonte ou referência
<i>pv glycines</i>	patógeno de leguminosas (feijão, soja)	
333	tipo selvagem	Instituto Biológico de Campinas - (I.B.) S.P.
333Sm ^r	mutante espontâneo, resistente à estreptomicina, derivado da linhagem 333	Laboratório Genética de Microrganismos (UNICAMP)
333Sm ^r [pMV04]	333Sm ^r contendo o plasmídeo pMV04	Este trabalho
333Sm ^r [pMV08]	333Sm ^r contendo o plasmídeo pMV08	Este trabalho
333Sp ^r	mutante espontâneo resistente à espectinomicina, derivado da linhagem 333	Laboratório Genética de Microrganismos (UNICAMP)
333Sp ^r [pMV08]	333Sp ^r contendo o plasmídeo pMV08	Este trabalho
<i>pv manihotis</i>	patógeno de mandioca	
289	tipo selvagem	Instituto Biológico de Campinas (IB)
289 NaI ^r	mutante espontâneo, resistente ao ácido nalidíxico, derivado da linhagem 289	Laboratório Genética de Microrganismos (UNICAMP)
289NaI ^r / pUFR027	mutante 289 NaI ^r contendo apenas o vetor pUFR027	Laboratório Genética de Microrganismos (UNICAMP)

Tabela 1: Continuação

Linhagens	Características	Fonte ou referência
289NaI ^F [pMV04]	clone obtido do cruzamento de 289NaI ^F com banco genômico da linhagem 317, com alteração na viscosidade e morfologia da colônia	Este trabalho
289NaI ^F [pMV08]	clone obtido do cruzamento de 289NaI ^F com banco genômico da linhagem 317, com alteração na viscosidade e morfologia da colônia	Este trabalho
289Sm ^F	mutante espontâneo resistente à estreptomicina, derivado da linhagem 289	Laboratório Genética de Microorganismos (UNICAMP)
289Sm ^F [pMV08]	289Sm ^F contendo o plasmídeo pMV08	Este trabalho
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ <i>Sup E44 D lac U169 (800 lac Z D M15) hsd R17 rec A1 end A1 gyr A 96 Thi⁻ rel A1</i>	Bethesda Research Laboratories

Tabela 2 - Plasmídios.

Plasmídios	Características	Fonte ou referência
pBKS ⁺	Amp ^r com 2,96kb	Stratagene
pUFR027	IncW, Nm ^r , Mob ⁺ , MobP, lacZa ⁺ , Par ⁺ com 9,3kb	De Feyter <i>et al.</i> , 1990.
pRK2073	derivado de pRK2013 npt: Tn7, Km ^r , Sp ^r , Tra ⁺ , plasmídio "helper"	Leong <i>et al.</i> , 1982
pKS04	pBKS contendo o fragmento <i>EcoRI</i> de 2,8kb de DNA genômico de <i>X. c. pv. vesicatoria</i> (317)	Este trabalho
pKS08	pBKS contendo o fragmento <i>EcoRI</i> de 3,9kb de DNA genômico de <i>X.c. pv. vesicatoria</i> (317)	Este trabalho
pMV04	pUFR027 contendo o fragmento <i>EcoRI</i> de 2,8kb de DNA genômico de <i>X. c. pv.</i> <i>vesicatoria</i> (317)	Este trabalho
pMV08	pUFR027 contendo o fragmento <i>EcoRI</i> de 3,9kb de DNA genômico de <i>X.c. pv.</i> <i>vesicatoria</i> (317)	Este trabalho
pMV2,3-8	pUFR027 contendo o fragmento de 2,3 kb derivado do pMV08 através de digestão com <i>KpnI</i>	Este trabalho
pMV1,6-8	pUFR027 contendo o fragmento de 1,6 kb derivado do pMV08 através de digestão com <i>KpnI/EcoRI</i>	Este trabalho
pMV2,0-8	pUFR027 contendo o fragmento de 2,0kb obtido da deleção que corresponde ao de 2,3kb deletado em 300 pares de bases	Este trabalho

3.2. MEIOS DE CULTURA

3.2.1. Meio de cultura para *Xanthomonas*

As linhagens de *Xanthomonas campestris* foram cultivadas meio de cultura NYGB e NYGA (meio NYGB acrescido de 15,0g de ágar por litro) (Turner *et al.*, 1984), à 28°C.

NYGB:	Peptona	5,0g
	Extrato de Levedura	3,0g
	Glicerol	20,0g
	H ₂ O q.s.p.	1 litro

O pH foi ajustado para 7,0 e a solução foi autoclavada a 120°C por 20 minutos.

3.2.2. Meio de Fermentação

Para as fermentações foi utilizado o meio de cultura MPI - Meio de Produção I (Sow e Demain, 1979).

MPI: Sacarose	20,0g
KH ₂ PO ₄	5,0g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0g
ácido cítrico	2,0g
H ₃ BO ₃	0,006 g
ZnO	0,006g
FeCL ₃ . 6H ₂ O	0,0024g
CaCO ₃	0,02g
H ₂ O q.s.p.	1 litro

O pH foi ajustado para 7.2 com NaOH e a solução foi autoclavada a 120°C por 20 minutos.

3.2.3. Meio de cultura para *Escherichia coli*

O meio de cultura utilizado para o crescimento de *Escherichia coli* foi o meio completo LB (Luria Bertani), à 37°C.

LB:	Triptona	10,0g
	Extrato de Levedura	5,0g
	NaCl	5,0g
	H ₂ O q.s.p.	1 litro

Quando sólido, adicionou-se 15,0g de ágar.

O pH foi ajustado para 7,0 e a solução foi autoclavada a 120°C por 20 minutos.

3.2.4. Antibióticos

As concentrações de antibióticos utilizadas em meio de cultura sólido foram: ácido nalidíxico (Nal), 50 μ g/ml; kanamicina (Km), 25 μ g/ml; espectinomicina (Sp), 50 μ g/ml; estreptomicina (Sm), 100 μ g/ml; ampicilina (Ap), 60 μ g/ml. Em meio líquido, as concentrações foram reduzidas em 50%.

3.2.5. Meios de detecção de enzimas extracelulares

A caracterização dos clones quanto à produção de enzimas extracelulares foi realizada através dos meios seletivos descritos a seguir:

A) Meio para detecção de atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada pela degradação de proteínas do leite em placas de meio de cultura NYGA, descrito acima, contendo 2% de leite desnatado segundo metodologia de Tang *et al.* (1987), onde foram verificados halos ao redor das colônias consideradas positivas.

B) Meio para detecção de atividade amilolítica

Utilizou-se o meio NYGA contendo amido solúvel 0,2%, sendo que a revelação foi realizada com vapor de iodo, permitindo a visualização dos halos de formados pelas colônias positivas.

C) Meio para detecção de atividade lipolítica

Peptona	10,0g
NaCl	5,0g
CaCl ₂	0,1g
Ágar	15,0g
H ₂ O q.s.p.	1 litro

O pH foi ajustado para 6,0 e a solução foi autoclavada a 120°C por 20 minutos.

Seguiu-se a metodologia de Sierra (1957), adicionando-se Tween 20 na concentração de 1% no meio de cultura. A detecção foi realizada pelo aparecimento de um precipitado de cristais de sal de cálcio ao redor das colônias positivas.

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

Meio M9 q.s.p.	1 litro
Glicerol	5,0g
Carboximetilcelulose	5,0g
Extrato de levedura	1,0g
Ágar	15,0g

O pH foi ajustado para 7,0, a solução foi autoclavada a 120°C por 20 minutos e a revelação foi realizada através da detecção de halos ao redor das colônias após coloração com Congo-Red na concentração de 0,1%.

E) Meio para detecção de atividade pectolítica (Bocarra *et al.*, 1982 com modificação do substrato utilizado)

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

O pH foi ajustado para 7,0, a solução foi autoclavada a 120°C por 20 minutos e a revelação foi realizada pela adição de brometo de hexadeciltrimetil amônio na concentração de 1% sobre o meio de cultura contendo as colônias, onde se observou o aparecimento de um precipitado.

Meio M9:	Sais de M9	200ml
	Glicose 20%	20ml
	H ₂ O q.s.p.	1litro
Sais M9:	Na ₂ H ₂ PO ₄ .7H ₂ O	2,56g
	KH ₂ PO ₄	0,60g
	NaCl	0,10g
	NH ₄ Cl	0,20g
	H ₂ O q.s.p.	200ml

A solução foi autoclavada a 120°C por 20 minutos.

3.3. CONJUGAÇÃO

Foi efetuado um cruzamento da linhagem 289Nal^r (*Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*) com o banco genômico da linhagem selvagem 317 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*). A conjugação "em massa" foi realizada através de cruzamentos triparentais (Ditta *et al.*, 1980) utilizando-se o plasmídio "helper" pRK2073 (Leong *et al.*, 1980).

As células doadoras (banco genômico) foram cultivadas em meio LB contendo o antibiótico kanamicina por aproximadamente 16 h à 37°C com agitação de 180 rpm.

As bactérias contendo o plasmídio "helper" foram incubadas nas mesmas condições porém o antibiótico utilizado foi espectinomicina.

As células receptoras (*Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*) foram cultivadas em meio NYGB contendo ácido nalidíxico, por aproximadamente 16h à 28°C e 180 rpm.

Foram centrifugados 2 ml da cultura receptora em tubo de microcentrífuga esterilizado. O sobrenadante foi descartado e 0,5 ml da cultura contendo o plasmídio helper foi centrifugado no mesmo tubo, formando um segundo sedimento. O sobrenadante também foi descartado e 0,1 ml da cultura doadora (banco genômico) foi centrifugado. As células foram lavadas com solução salina 0.9% e com o resíduo do sobrenadante, cerca de 100ul, ressuspendeu-se o sedimento final.

A suspensão contendo as linhagens a serem conjugadas foi transferida para uma placa de meio NYGB, sem antibiótico, em forma de gotas (aproximadamente 30µl cada) e foi incubada à 28°C por aproximadamente 20 horas.

Após este período, foi retirada a massa celular obtida a partir de uma das gotas e foram feitas diluições de 10⁻¹ e 10⁻² em solução salina com posterior plaqueamento em meio NYGB contendo os antibióticos kanamicina e ácido nalidíxico para a seleção dos transconjugantes.

3.4. EXTRAÇÃO DE PLASMÍDIOS

Os plasmídios foram extraídos pelo método de lise alcalina descrito por Birnboim e Doly, 1979, com algumas modificações descritas por Maniatis *et al.*, 1982.

A análise dos fragmentos foi feita através de eletroforese em gel de agarose 0.8%, utilizando-se tampão TAE (Tris-Acetato, 0,04M e EDTA, 0,001M). Os géis foram corados com brometo de etídeo (10 mg/ml), visualizados em fonte de luz U.V. e fotografados com filme Polaroid 667.

3.5. LIGAÇÃO INSERTO/VETOR

O sistema de ligação foi preparado de forma que a relação molar foi de 2:1.

A reação foi efetuada num volume total de 20 μ l. A enzima T4 DNA ligase (BRL) foi utilizada segundo especificações do fabricante.

3.6. TRANSFORMAÇÃO

A transformação foi realizada utilizando-se células competentes da linhagem de *E.coli* DH5 α preservadas à -70°C, segundo Sambrook *et al.* (1989).

As células transformadas foram selecionadas por resistência ao antibiótico apropriado e as colônias contendo o inserto foram identificadas devido à adição de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo) 2% (40 μ l por placa) em placas de meio de cultura LB segundo Maniatis *et al.* (1982). Não foi necessária a adição do indutor IPTG para a expressão do gene β -gal pois a linhagem de *E.coli* utilizada não apresenta o gene *lacI^q* (super-produtor de repressor).

As colônias brancas, contendo os insertos, foram isoladas, transferidas para placas contendo o antibiótico apropriado e analisadas posteriormente, através de extração de DNA de plasmídios.

3.7. FERMENTAÇÃO

O experimento de fermentação consistiu de um pré-inóculo das culturas crescido em 5ml de meio NYGB contendo os antibióticos apropriados à 28°C, 180 rpm por um período de aproximadamente 18 horas.

Posteriormente a absorvância do pré-inóculo, medida em espectrofotômetro (600nm), foi acertada para 1.0 e 2ml deste foi adicionado à 20ml de meio de Produção I (MPI), sem antibiótico, e incubado nas mesmas condições descritas acima, porém por 72 horas.

Após este período, a viscosidade do caldo de fermentação foi medida em viscosímetro da marca Brookfield modelo RVT, utilizando-se spindle 21 e rotações de 20, 50 e 100 rpm.

3.8. TESTE DE FITOPATOGENICIDADE

Para os testes de fitopatogenicidade foram utilizadas plantas de mandioca *Manihot esculenta*, tomate *Lycopersicon esculentum* e pimentão *Capsicum annuum* que foram cultivadas numa casa de vegetação, em sacos plásticos com terra adubada, por um período de aproximadamente 8 semanas, após o que foram inoculadas.

O inóculo foi feito a partir de culturas estocadas em glicerol à -70°C. Após aproximadamente 16h de crescimento em meio líquido, ajustou-se a absorvância (Abs.)

culturas foram lavadas e ressuspendidas em solução salina 0,9%

O método de inoculação selecionado foi o de infiltração. Utilizou-se seringas de 1ml que foram pressionadas contra a superfície inferior das folhas, de forma que a suspensão bacteriana penetrasse no tecido da planta, acarretando um encharcamento no ponto de inoculação.

Após a aplicação dos testes, as plantas foram cobertas por um saco plástico transparente e vedadas com fita adesiva, para conservar a umidade e facilitar a manifestação dos sintomas. Estes foram observados a partir do 5º dia de inoculação.

3.9. CURVA DE CRESCIMENTO

O crescimento *in vitro* das colônias foi monitorado através de medidas de absorbância (Abs.) dos meios de cultura, em espectrofotômetro, por leitura a 600nm e por plaqueamento das diversas alíquotas. Os pré-inóculos das culturas foram crescidos durante à noite e em seguida foram adicionados 2ml em 40ml de meio de cultura NYGB contendo os antibióticos apropriados. A absorbância para as quatro linhagens foi de aproximadamente 0.09 no tempo considerado como zero (T=0h). Posteriormente novas alíquotas foram retiradas em intervalos de 3 horas até que se completassem 33 horas para leitura em espectrofotômetro e plaqueamento.

Os valores médios de duas repetições para cada alíquota foram utilizados na elaboração da curva de crescimento.

3.10 VETOR PARA SUBCLONAGEM DOS FRAGMENTOS OBTIDOS

O vetor selecionado para os experimentos de subclonagem foi o plasmídio pBluescript KS⁺ (Figura 1). Ele é derivado dos plasmídios da série pUC e seus "primers" podem ser utilizados para sequenciamento de ambas as fitas dos insertos.

A denominação KS refere-se apenas à orientação da região de policlonagem, com relação às enzimas que ficam nas extremidades (*KpnI* -> *SacI*). Possui também um gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina.

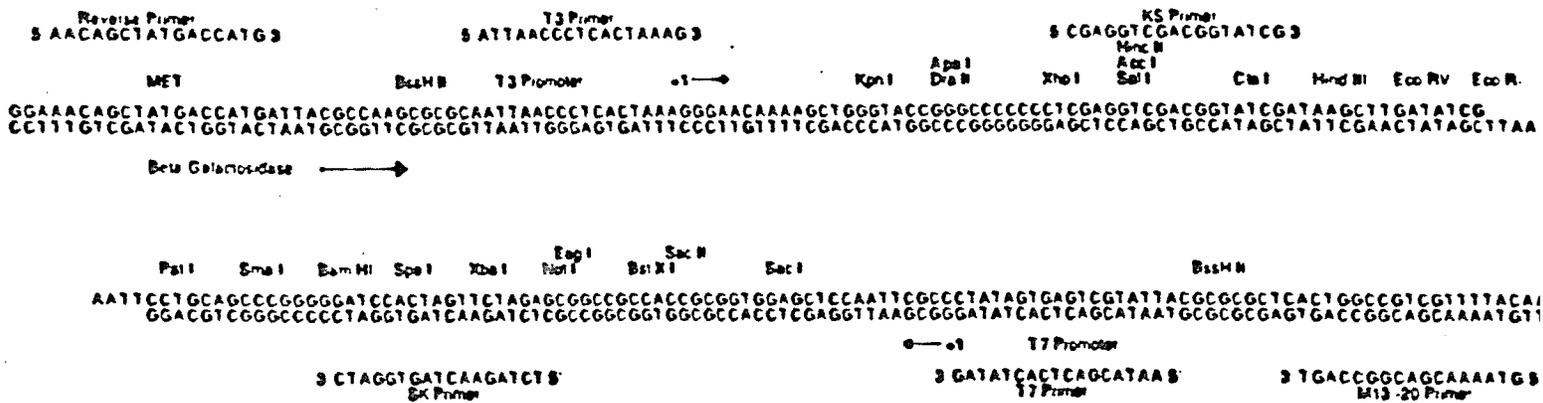
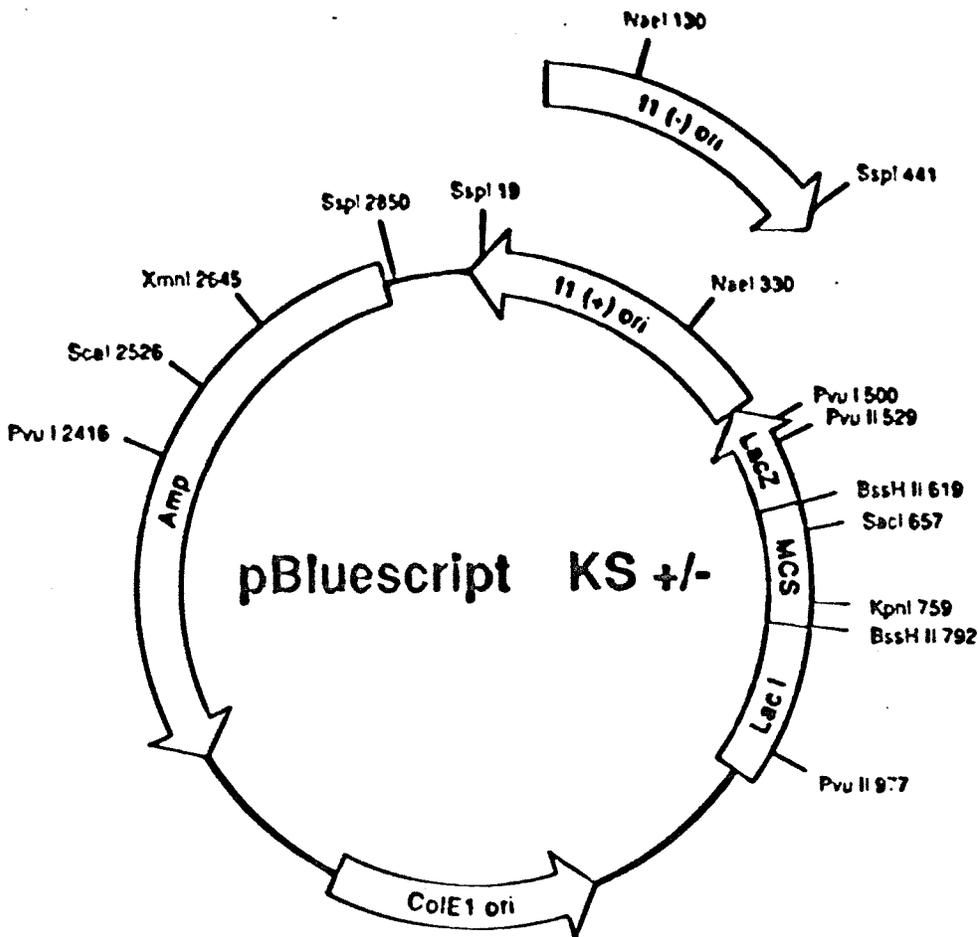


Figura 1: Mapa do plasmídeo pBluescript KS⁺.

3.11. GEL DE SEQUENCIAMENTO

3.11.1. TRATAMENTO DAS PLACAS

A) Lavagem: As placas ficaram durante à noite em NaOH 0,4N. Posteriormente foram lavadas com água e detergente, finalmente com SDS 2% e enxaguadas com água.

B) Desengorduração: As placas foram desengorduradas com etanol, seguido de acetona com papel fino e absorvente.

C) Aderência do gel: A placa menor, foi tratada com uma solução contendo 5ml de etanol, 175ul de ácido acético e 17ul de Bind-Silane, espalhando-se com papel em movimentos circulares.

D) Para repelir o gel: A placa maior foi tratada com 5ml de Repil-Silane com papel em movimentos circulares. O excesso de Repil foi retirado com um pouco de água e papel, sem esfregar.

3.11.2. MONTAGEM DAS PLACAS

A placa maior foi colocada com o lado tratado para cima, sobre um suporte de tubos.

Os espaçadores foram colocados e a placa menor foi colocada sobre a maior, com o lado tratado para dentro, de forma que as duas placas ficaram juntas com os espaçadores no meio.

3.11.3. PREPARO DO GEL

A) Preparo de acrilamida 40%: Em uma proveta de 100ml foi adicionado 38,0g de acrilamida e 2,0g de N,N'methylendiacylamida e 80ml de água milli-Q e dissolveu-se em banho-maria à 40°C. Finalmente o volume foi acertado para 100ml e adicionou-se 1g de Resina AG 501-X8(D) e agitou-se por 1 hora.

B) Tampão TBE 5X: Para um litro de tampão TBE 5X foi adicionado 60,55g de Trizma Base; 25,67g de ácido bórico e EDTA em 800ml de água milli-Q. O pH foi acertado para 8.3 e completou-se o volume para 1 litro.

C) Preparo do Gel: Em uma proveta de 80ml foi adicionado 25,2g de uréia, 7,5ml de acrilamida 40% para o gel 5% e 9,0ml para o gel 6% e 12ml de TBE 5X. Água milli-Q foi adicionada até 50ml e incubou-se em banho-maria à 60°C para dissolução. Posteriormente o volume final foi acertado para 60ml e esta solução foi filtrada num filtro descartável 0,45 μ m. Imediatamente antes de se colocar o gel na placa, foi feita uma solução de persulfato de amônio na concentração de 100mg/ml (480 μ l de persulfato de amônio e 30 μ l de TEMED) e que foi adicionada ao gel. A placa foi nivelada, com ajuda de um tubo de ensaio com água e posteriormente foi inclinada para que o gel fosse colocado. Após 1 ou 2 horas à temperatura ambiente o gel já polimerizado, foi mantido em geladeira durante à noite.

A corrente foi de 2.000 volts, sendo que a potência máxima foi estabelecida para 50 watts para o conjunto de géis, os quais foram montados no sistema de eletroforese Macrophor (LKB). A corrida levou aproximadamente 3 horas, para a saída do corante azul de bromofenol, para o gel de 6% correspondente às sequências próximas ao "primer" e 8 horas, incluindo 2 horas adicionais após a saída do segundo corante (xileno cianol), para o gel 5%, de sequências mais afastadas deste.

Finalmente as placas foram desmontadas, o gel foi fixado em 10% de metanol e 10% de ácido acético por 30 minutos com agitação moderada. O excesso de metanol e

ácido acético foi retirado por lavagens em água corrente e os géis foram secos em estufa à 42°C após um período de aproximadamente 20 horas.

Posteriormente filmes de raios-X (Hyperfilm-MP Amersham 18 x 43cm) foram colocados sobre os gels e o sistema foi mantido no escuro entre 4 e 7 dias, à temperatura ambiente, sendo revelados a seguir.

3.12. SEQUENCIAMENTO

Para sequenciamento dos clones foram utilizados 10ug de DNA. Este foi denaturado com tampão de denaturação 2X (1ml de NaOH 2M; 4 μ l de EDTA 0.5M e água para um volume final de 5ml). Após 5 minutos, a denaturação foi interrompida com 8 μ l de acetato de amônio 2,5M, pH 4.5 e 180 μ l de etanol gelado. O material foi precipitado por 2 horas à -20°C, centrifugado por 20 minutos e o sedimento foi lavado com etanol 70%, centrifugado novamente. Após secagem do sedimento, o mesmo foi redissolvido em 25 μ l de água. Aliquotas de 10 μ l foram utilizadas nas reações de sequenciamento segundo a técnica de dideoxi-nucleotídeos (Sanger *et al.*, 1977).

Para as reações, seguiu-se as especificações do fabricante. Os kits utilizados foram T7 sequencing (Pharmacia) e Taq track sequencing system deaza (Promega). Os produtos da reação de sequenciamento marcados radioativamente pela incorporação de (³⁵S) dATP α S (Amersham), foram analisados através de eletroforese em gel denaturante de poliacrilamida, carregando-se 2 μ l da reação.

Os insertos foram sequenciados com "primer" direto e "primer" reverso. Para o sequenciamento do primeiro experimento de deleção utilizou-se o "primer" reverso e para o segundo experimento, o "primer" direto.

3.13. DELEÇÃO UNIDIRECIONAL COM A ENZIMA EXONUCLEASE III

A técnica utilizada foi a descrita por Henikoff (1987), com algumas modificações. Este método é baseado na digestão com exonuclease III do fragmento de DNA a partir de uma de suas extremidades. Esta enzima ataca apenas as extremidades protuberantes 5' e abruptas e não as protuberantes 3'. O ataque na extremidade 5' cria extremidades protuberantes 3', esta fita remanescente de DNA é removida pela ação da S1 nuclease, na presença de cátions Zn^{++} , em pH ácido. Após inativação térmica desta enzima, adiciona-se polimerase Klenow para reparar as extremidades e finalmente os fragmentos são recircularizados através de ligação de suas extremidades (Figura 2).

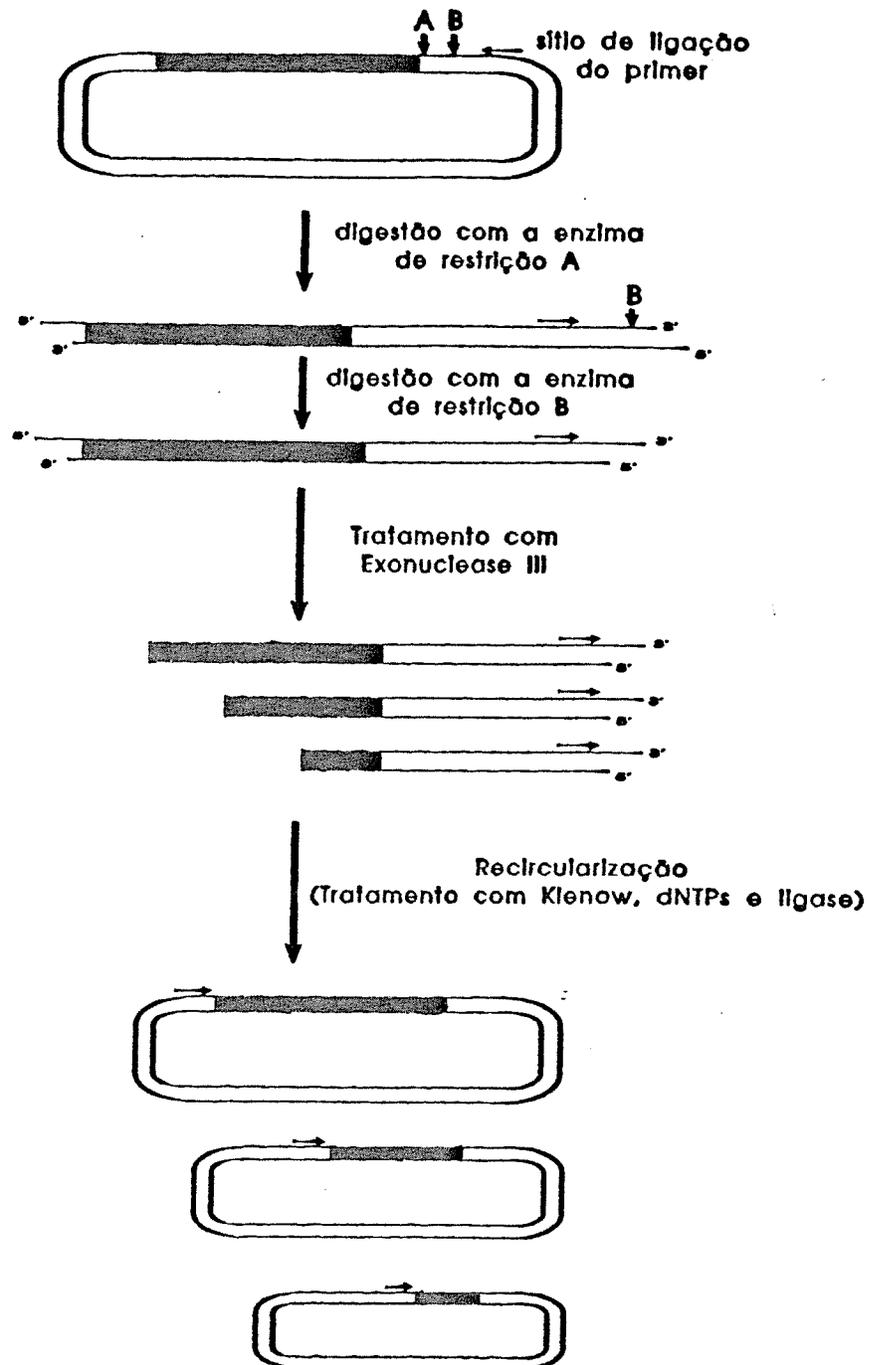


Figura 2: Diagrama esquemático do método de obtenção de deleções unidirecionais com exonuclease III.

Após mapeamento de restrição, aproximadamente 20 μg de DNA do plasmídeo pKS08 foram digeridos com a enzima *XhoI*, por aproximadamente 4 horas, com o objetivo de se obter uma extremidade 5' protuberante, para ser atacada pela exonuclease III. Após digestão, a enzima foi extraída com fenol: clorofórmio (1:1) e clorofórmio e o DNA foi precipitado com 0,1 volume de cloreto de sódio 2M e 2 volumes de etanol 100% gelado. A suspensão foi incubada a -70°C , por 30 minutos e em seguida centrifugada por 20 minutos a 4°C . Posteriormente o DNA foi seco, solubilizado em tampão TE e digerido por 4 horas com a enzima *ApaI* para se obter uma extremidade 3' protuberante e com isto protegê-la da ação da exonuclease III. A enzima foi extraída pelo mesmo método descrito acima. o DNA foi precipitado com 0,1 volume de NaCl 2M e 2 volumes de etanol e ressuspenso em tampão da exonuclease III (Tris-HCl, 66 mM pH 8.0; MgCl_2 0,66 mM).

A concentração de exonuclease III foi de 500U e S1 nuclease, 60U.

A reação foi realizada à 30°C e foram retiradas amostras de 1 em 1 minuto num total de 25 alíquotas, esperando-se obter 200 bases deletadas por minuto.

Para um segundo experimento de deleção, a digestão por exonuclease III foi feita no sentido oposto ao primeiro experimento, com o objetivo de se sequenciar o pKS08 inteiro. Utilizou-se a enzima *XbaI* para obtenção da extremidade 5' protuberante e *BstXI* para extremidade 3' protuberante.

As condições de experimento foram as mesmas descritas acima.

3.14. SOUTHERN BLOTTING E HIBRIDIZAÇÃO NÃO RADIOATIVA

A. Transferência alcalina

Antes da transferência, o gel foi submetido aos seguintes tratamentos:

- a. incubação em solução de depuração a temperatura ambiente por 15 minutos, com agitação suave, seguida de lavagem do gel com água bidestilada esterilizada.
- b. incubação em solução de denaturação por 30 minutos com agitação suave,
- c. incubação em tampão de transferência.

A transferência, do tipo alcalina e lenta, foi realizada com membrana de nylon Hybond N (Amersham), por capilaridade, durante à noite, seguindo-se a metodologia de Maniatis *et al.* (1982). A membrana foi lavada em solução SSC 2 vezes concentrada por alguns minutos e após secagem a temperatura ambiente, foi mantida a 80°C por 10 minutos para fixação do DNA.

B. Soluções e tampões utilizados

Solução de Depuração: HCl 0,25N.

Solução de Denaturação: NaCl 1,5M; NaOH 0,5M.

Tampão de Transferência: NaCl 1,5M; NaOH 0,25M.

Tampão SSC: NaCl 0,15M; citrato trissódico 0,015M.

C. Marcação do fragmento (sonda)

Foi utilizado como sonda o fragmento de *EcoRI* do plasmídeo pMV08, após dupla purificação em gel de agarose pelo método GeneClean (Bio 101 Inc.). Cerca de 200ng do fragmento foram inicialmente submetidas à denaturação (em um volume total de 20 μ l de água), por incubação a 100°C por 10 minutos; a seguir a solução foi mantida no gelo por 3 minutos. A marcação foi realizada por "*random primer extension*" utilizando-se o kit de marcação não radioativa do DNA com dUTP-11-digoxigenina (Boehringer Mannheim Biochemica): a 15 μ l da solução obtida após denaturação, foram acrescentados 2 μ l de mistura de hexanucleotídeos, 2 μ l de dNTP "labeling mixture" e 1 μ l da enzima Klenow (2U). A reação foi mantida a 37°C durante a noite. A precipitação da sonda foi realizada com 2 μ l de EDTA 0,2M (pH 8,0), 2,5 μ l de LiCl 4M e 75 μ l de etanol absoluto por 2 horas a -20°C. Após centrifugação, lavagem com etanol 70% e secagem do precipitado, o mesmo foi ressuscitado em 50 μ l de água a 37°C por 30 minutos.

Antes de se realizar a hibridização, a sonda foi denaturada por 5 minutos a 100°C e colocada imediatamente no gelo.

D. Hibridização e lavagens

A membrana foi pré-hibridizada a 42°C por aproximadamente 4 horas com solução SSC 5X concentrada contendo sarcosil 0,1%, dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,02%, agente bloqueador (kit marcação não radioativa da Boehringer Mannheim Biochemica) 2% e formamida deionizada 50%.

Após remoção da solução de pré-hibridização, 50ml de solução de hibridização (mesma composição que a anterior) contendo 50 μ l da sonda foram adicionados à membrana, mantendo-se o sistema sob agitação moderada a 42°C durante a

adicionados à membrana, mantendo-se o sistema sob agitação moderada a 42°C durante a noite.

Posteriormente, a membrana foi lavada com solução de SSC 2X contendo SDS 0,1%, por 15 minutos à temperatura ambiente (2 vezes) e com solução SSC 0,1X contendo SDS 0,1%, por 20 minutos à 60°C (2 vezes).

E. Detecção da sonda com AMPPD

O DNA marcado com digoxigenina (DIG) foi detectado através da utilização de anti-digoxigenina conjugada com a enzima fosfatase alcalina (AP), cuja ação enzimática sobre o substrato AMPPD [3-(2'-espiroadamantano)-4-metoxi-4-(3"-fosforiloxi)-fenil-1,2-dioxetano] produz luminescência detectável por exposição a um filme de raio-X.

Os reagentes utilizados foram os fornecidos no kit da Boehringer Mannheim Biochemica e o procedimento adotado é o que se segue (todas as etapas descritas foram realizadas a temperatura ambiente e sob leve agitação): após incubação da membrana em tampão de lavagem (1 a 5 minutos), a mesma foi mantida em tampão II por 30 minutos. O conjugado anti DIG-AP foi diluído em tampão II para concentração de 75mU/ml e a incubação da membrana foi realizada em 20ml dessa solução por 30 minutos. A membrana foi então mantida em 100ml de tampão de lavagem por 15 minutos (2 vezes) e equilibrada em 20ml de tampão III por 2 minutos. Posteriormente esta foi incubada com 20ml da solução de AMPPD diluída (0,1mg/ml em tampão III) por 5 minutos. Finalmente a membrana foi selada num saco plástico, mantida a 37°C por 10 minutos e exposta ao filme de raio-X por 10 minutos.

a. Tampões utilizados

Tampão I: ácido maleico 0,1M; NaCl 0,15M; o pH foi ajustado para 7,5 com NaOH sólido e a solução foi esterilizada por autoclavagem.

Tampão de lavagem: tampão I contendo Tween 20 0,3% (v/v).

Tampão II: tampão I contendo reagente bloqueador 1%.

Tampão III: Tris-HCl 0,1M; NaCl 0,1M; MgCl₂ 50mM (pH 9,5).

3.15. SUBCLONAGENS

Os fragmentos a serem subclonados foram isolados do gel de agarose (0,8%) após eletroforese e purificados pelo método GeneClean (Bio 101 Inc.), utilizando-se cerca de 2 μ g de DNA para a digestão. O vetor pUFR027 também foi digerido com as mesmas enzimas, isolado e purificado pelo mesmo método.

As reações de ligação foram realizadas de acordo com instruções do fabricante. A linhagem receptora para transformação (citada no item 3.6) foi *E.coli* DH 5 α e as colônias contendo os fragmentos foram selecionadas em placas de meio seletivo LB contendo o antibiótico kanamicina e X-Gal. Após extração de DNA, verificou-se a presença dos fragmentos e estes foram introduzidos em outras linhagens receptoras de *X.campestris* por eletrotransformação.

3.16. ELETROTRANSFORMAÇÃO

Os experimentos de eletrotransformação foram realizados para a introdução do pMV08 nas diversas linhagens receptoras de *X.campestris* e seguiu-se a metodologia de White & Gonzales (1991), utilizando-se o eletroporador *E.coli Pulser* (Bio Rad) com voltagens de 14 e 12kV/cm para cubetas de 0,1cm de distância entre os polos. A duração do pulso foi fixada em 5 milisegundos. O meio utilizado foi glicerol a 10%, sendo as células preparadas da seguinte forma: Cerca de 35ml de meio de cultura NYGB foram inoculados com 4ml de uma cultura crescida durante à noite e incubados sob agitação à 28°C e 180rpm até se obter uma D.O. de 0,5 a 0,65 (leitura em 640nm). A cultura foi centrifugada por 20 minutos a 4000rpm à 4°C, em tubos previamente gelados. O sedimento foi lavado em 20ml de água bidestilada, esterilizada e gelada, sem ressuspender. Este processo foi repetido utilizando-se 10ml de água. Após as lavagens, o precipitado foi ressuspensionado em 7ml de glicerol 10% gelado e centrifugado novamente, nas mesmas condições descritas acima. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi novamente ressuspensionado em 3,5ml de glicerol 10% gelado, centrifugado e finalmente ressuspensionado em 1,75 de glicerol 10% gelado. Aliquotas de 60µl foram transferidas para tubos de microcentrífuga gelados e esterilizados e adicionou-se o DNA a ser introduzido na linhagem numa concentração de aproximadamente 100ng. A mistura foi transferida para a cubeta e após o pulso adicionou-se 1ml de meio de cultura NYGB e incubou-se por 1 hora à 28°C, 180rpm . Posteriormente a cultura foi plaqueada em meio NYGB contendo o antibiótico apropriado e a presença dos plasmídios foi confirmada por extração de DNA e análise, através de eletroforese, em gel de agarose.

4. RESULTADOS

4.1. ISOLAMENTO DOS CLONES DE EPS

Foi efetuado um cruzamento da linhagem 289Nal^r, um mutante espontâneo resistente ao antibiótico ácido nalidíxico derivado da linhagem 289 (*Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*), considerada uma das melhores linhagens produtoras de goma, com o banco genômico da linhagem selvagem 317 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*). O banco foi construído no vetor de clonagem pUFR027, com fragmentos digeridos com a enzima *EcoRI* (Marques, 1992) e mantido em *Escherichia coli* DH5 α .

Após conjugação, os transconjugantes obtidos foram transferidos para placas de meio NYGB contendo antibióticos ácido nalidíxico e kanamicina, a fim de se observar alguma alteração na morfologia das colônias.

Foram obtidos 444 transconjugantes e foi verificado que 12 colônias apresentavam alterações na morfologia, indicando um possível aumento de viscosidade. Dentre elas, 2 se destacaram. Após 24 horas da inoculação, essas colônias produziram uma certa quantidade de goma que provocou um "gotejamento" desta na tampa de placa (Figura 3).

Estas colônias foram denominadas 289Nal^r[pMV04] e 289Nal^r[pMV08].

Devido ao baixo rendimento de plasmídios obtidos em extrações de *X.campestris* foi feita a transferência desses plasmídios para *E. coli* DH 5 α por transformação.

Isto assegurou uma maior quantidade de DNA dos fragmentos para etapas posteriores.

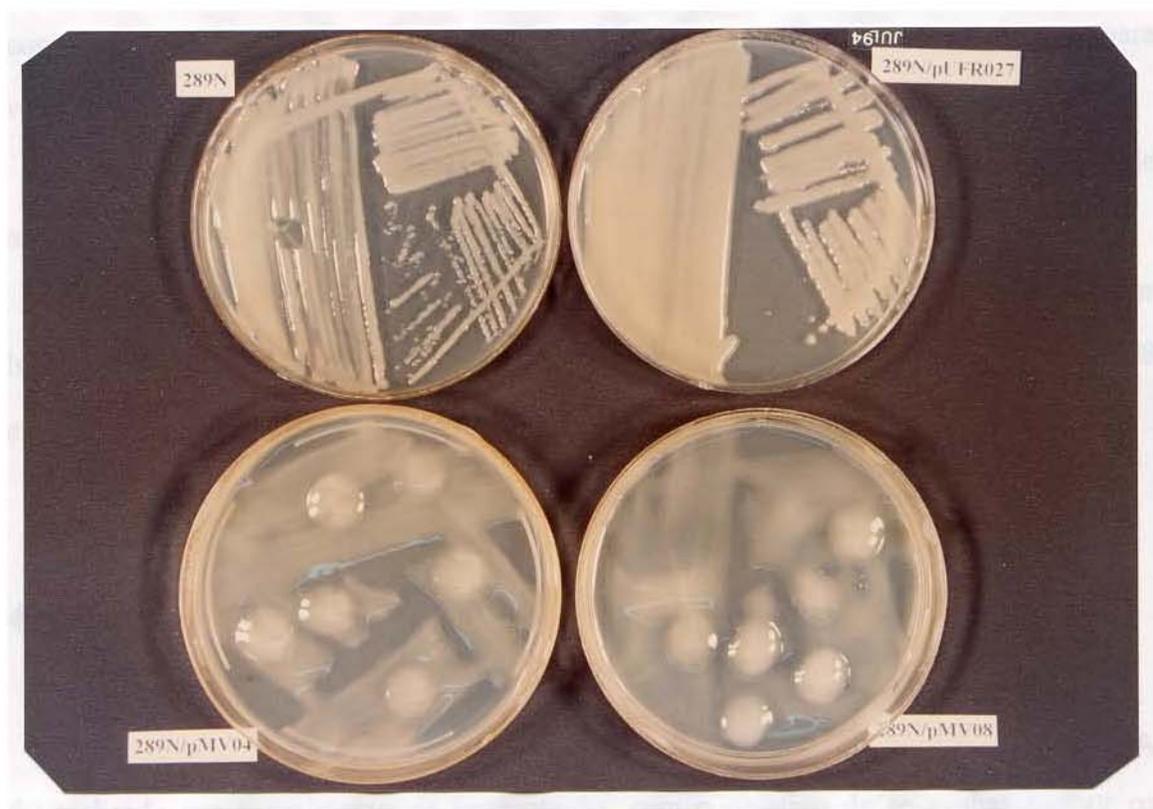


Figura 3: Placas com meio de cultura mostrando o "gotejamento" dos clones $289\text{NaI}^{\text{r}}[\text{pMV04}]$ e $289\text{NaI}^{\text{r}}[\text{pMV08}]$ com relação à 289NaI^{r} e $289\text{NaI}^{\text{r}}[\text{pUFR027}]$.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS CLONES OBTIDOS

O DNA plasmidial dos clones 289NaI^r[pMV04] e 289NaI^r[pMV08] foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI* (BRL), segundo especificações do fabricante, para verificação do tamanho dos fragmentos.

A análise dos fragmentos revelou que o plasmídeo pMV04 possui um inserto de aproximadamente 2,8kb e o pMV08 de aproximadamente 3,9kb (Figura 4).

Um experimento de hibridização foi realizado com o objetivo de se verificar homologia entre esses plasmídios. A sonda utilizada foi o fragmento de 3,9kb do pMV08 e nenhuma homologia foi detectada.

4.2.1. Fermentação

Após visualização, em placa, de um possível aumento na viscosidade das colônias, foi realizado um experimento de fermentação, com o objetivo de se avaliar melhor os clones 289NaI^r[pMV04] e 289NaI^r[pMV08].

O vetor pUFR027 foi introduzido na linhagem 289NaI^r para ser utilizado, posteriormente, como controle.

Observando-se a Tabela 3 podemos verificar que a linhagem 289NaI^r e 289NaI^r[pUFR027] foram semelhantes com relação à viscosidade do caldo. Entretanto o resultado obtido com os clones foi inesperado. Pela observação em placas pudemos observar um "gotejamento" das colônias com apenas 24 horas de incubação (Figura 3), mas quando fermentadas, a viscosidade do caldo foi praticamente zero com relação à linhagem original 289NaI^r.

Com os dados apresentados pela linhagem 289NaI^r contendo o vetor pUFR027 semelhantes às da linhagem 289NaI^r, podemos concluir que as alterações de viscosidade observadas nos clones 289NaI^r[pMV04] e 289NaI^r[pMV08] são devido aos insertos .

Tabela 3 - Efeito do pMV04 e pMV08 na viscosidade (cps) da linhagem 289NaI^r, medida à temperatura ambiente

Linhagens	20rpm	50rpm	100rpm
289 NaI ^r	916,70	415,00	247,50
289NaI ^r [pUFR027]	887,50	468,00	242,50
289NaI ^r [pMV04]	12,50	10,00	7,50
289NaI ^r [pMV08]	2,50	2,17	2,17

Obs: Média de três repetições. A análise estatística dos dados encontra-se no Apêndice I (página 107).

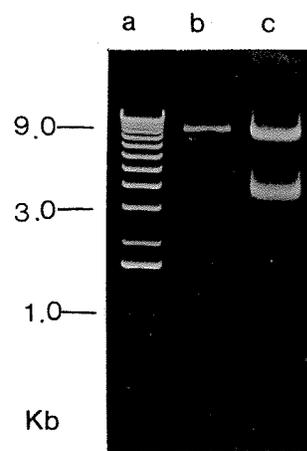


Figura 4: a) DNA ladder com 1,0kb

b) pMV04 digerido com *EcoRI*

c) pMV08 digerido com *EcoRI*

4.2.2. Testes de fitopatogenicidade

Uma vez que a introdução do pMV04 e pMV08 na linhagem 289NaI^r causou um decréscimo na viscosidade, testes de fitopatogenicidade foram realizados a fim de se verificar alguma alteração no poder de virulência.

A planta para este teste foi a mandioca e as linhagens selecionadas foram: 289 (*Xanthomonas campestris* pv.*manihotis*) como controle positivo; 333 (*Xanthomonas campestris* pv.*glycines*) como controle negativo; água como controle de inoculação e os clones 289NaI^r[pMV04] e 289NaI^r[pMV08] a serem testados.

No 5^o dia os sintomas já estavam bem característicos nas folhas inoculadas com a linhagem 289N. No ponto de inoculação pode-se observar o encharcamento e a mancha angular, característica da doença. A linhagem 333 causou apenas uma resposta de hipersensibilidade da planta. Alguns pontos de inoculação, a princípio, iniciaram um processo de doença, mas esta não evoluiu. Quanto aos clones, tanto o 289N[pMV04] quanto o 289N[pMV08] não causaram sintomas de doença nas folhas, tendo sido observada apenas a resposta de hipersensibilidade (Figura 5).

Uma vez que o banco genômico utilizado foi do patovar *vesicatoria*, realizou-se também testes em plantas de tomate. As linhagens selecionadas foram : 317 (*Xanthomonas campestris* pv.*vesicatoria*) como controle positivo; 289NaI^r e 289NaI^r[pUFR027] (*Xanthomonas campestris* pv.*manihotis*); como controle negativo, a água como controle da inoculação e os clones 289NaI^r[pMV04] e 289NaI^r[pMV08] a serem testados.

Neste teste, os sintomas foram observados a partir do 3^o dia de inoculação nas folhas inoculadas apenas com a linhagem 317. As demais linhagens, 289NaI^r, 289NaI^r[pUFR027], 289NaI^r[pMV04] e 289NaI^r[pMV08] causaram apenas uma resposta de hipersensibilidade da planta no ponto de inoculação, não sendo observados sintomas da doença (Figura 6).

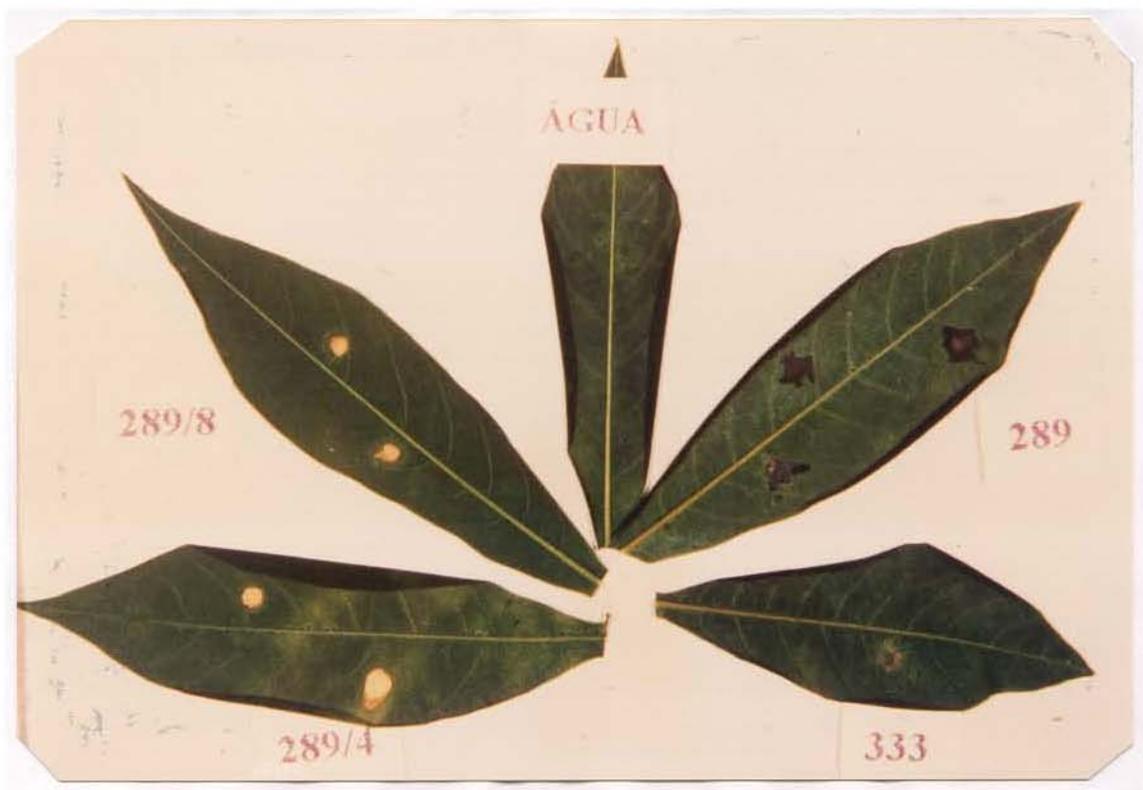


Figura 5: Teste de fitopatogenicidade em plantas de mandioca.

289 (*X.campestris* pv.*manihotis*), controle positivo

333 (*X.campestris* pv.*glycines*), controle negativo

289NaI^r[pMV04] (*X.campestris* pv.*manihotis*)

289NaI^r[pMV08] (*X.campestris*pv.*manihotis*)

Água - controle da inoculação

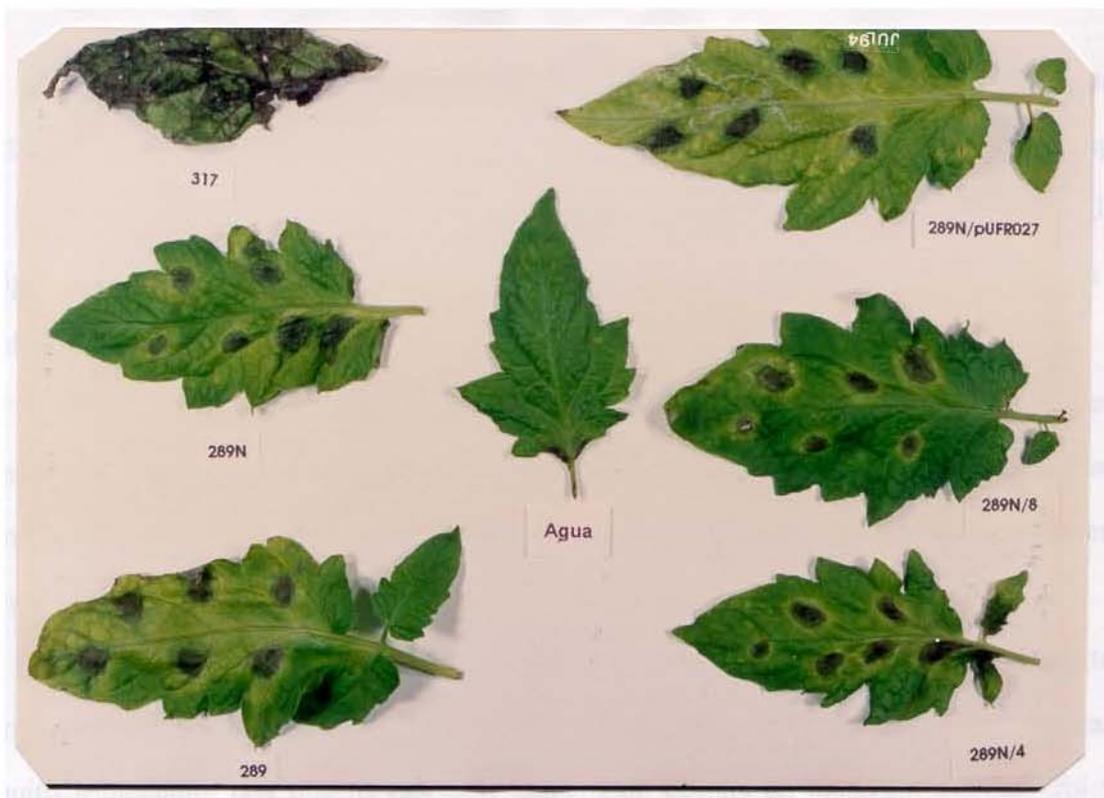


Figura 6: Teste de fitopatogenicidade em plantas de tomate.

317 (*X.campestris* pv.*vesicatoria*), controle positivo

289Nal^r (*X.campestris* pv.*manihotis*), controle negativo

289Nal^r[pUFR027] (*X.c.* pv.*manihotis*), controle negativo

289Nal^r[pMV04] (*X.campestris* pv.*manihotis*)

289Nal^r[pMV08] (*X.campestris* pv.*manihotis*)

Água - controle da inoculação

4.2.3. Curva de crescimento

Este experimento foi realizado para se verificar a taxa de crescimento dos clones 289NaI^r[pMV04] e 289NaI^r[pMV08] com relação à linhagem original, uma vez que, após a introdução dos plasmídios, a viscosidade decresceu a níveis próximos de zero. Uma hipótese para este fato seria a redução no número de células nos clones contendo os referidos plasmídios.

Pela análise da Figura 7, que corresponde ao monitoramento do crescimento celular através da absorbância (Abs.) do meio de cultura, podemos verificar que as quatro linhagens testadas se comportaram de maneira semelhante, não havendo diferença significativa entre elas.

Com relação à Figura 8, que corresponde ao monitoramento por plaqueamento e contagem do número de células, verificou-se que, embora a absorbância se mostrasse muito semelhante nos quatro casos, o número de células da linhagem 289NaI^r foi um pouco maior com relação às outras linhagens. Entretanto este resultado não foi considerado como significativo porque nos experimentos de fermentação as linhagens tiveram a absorbância acertada para 1,0 e o meio de cultura (MPI) utilizado propicia a produção de goma xantana das células contidas no meio e não o crescimento no número de células. Assim, a linhagem 289NaI^r[pUFR027] foi considerada como controle dos experimentos, pois na curva de crescimento ela se comportou semelhante aos clones e no experimento de fermentação, ela apresentou viscosidade semelhante à linhagem original 289NaI^r.

Assim, podemos concluir que a diferença na viscosidade observada nos clones foi, realmente, devida à presença dos insertos e não devido à diferença no número de células.

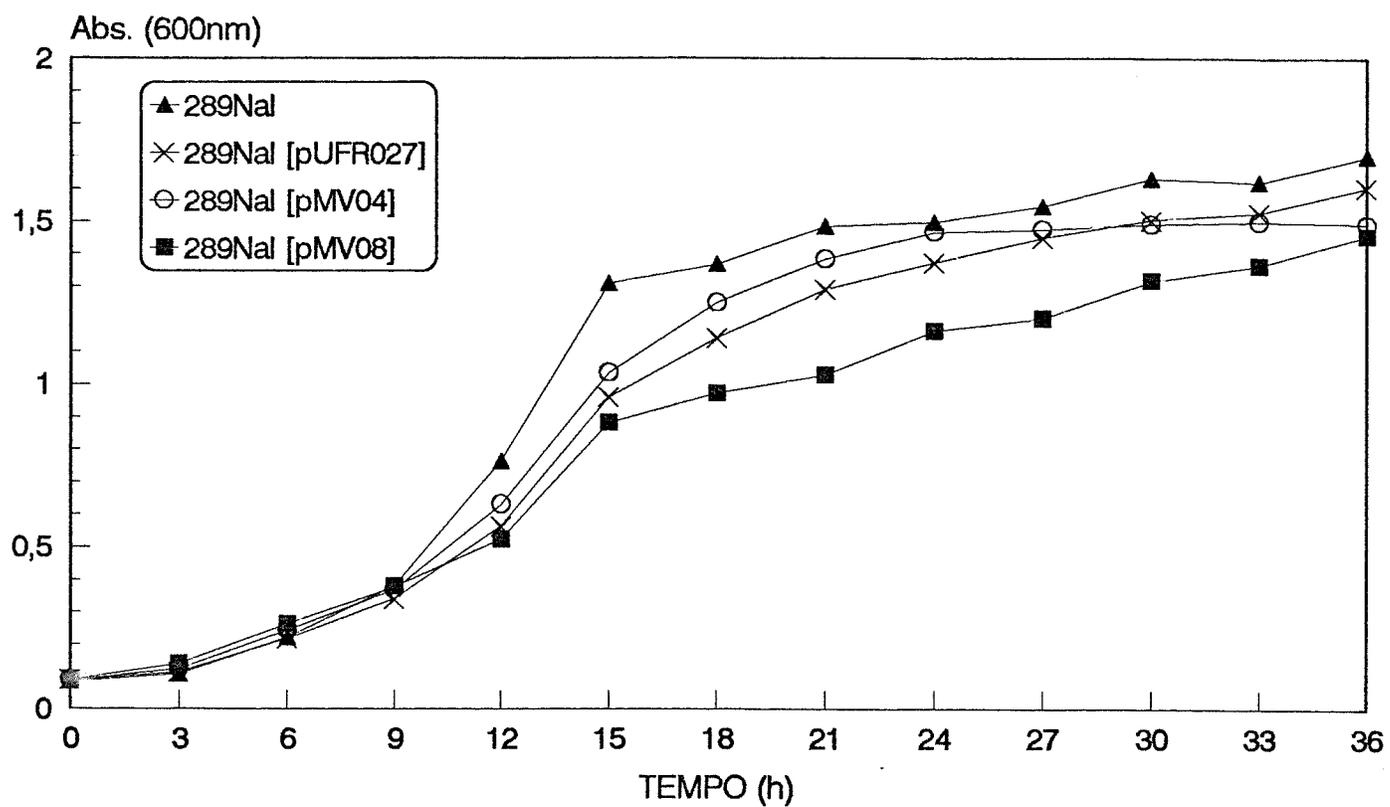


Figura 7: Curva de crescimento com relação à absorbância (Abs.) das linhagens 289Nal^r, 289N[pUFR027], 289N[pMV04] e 289N[pMV08].

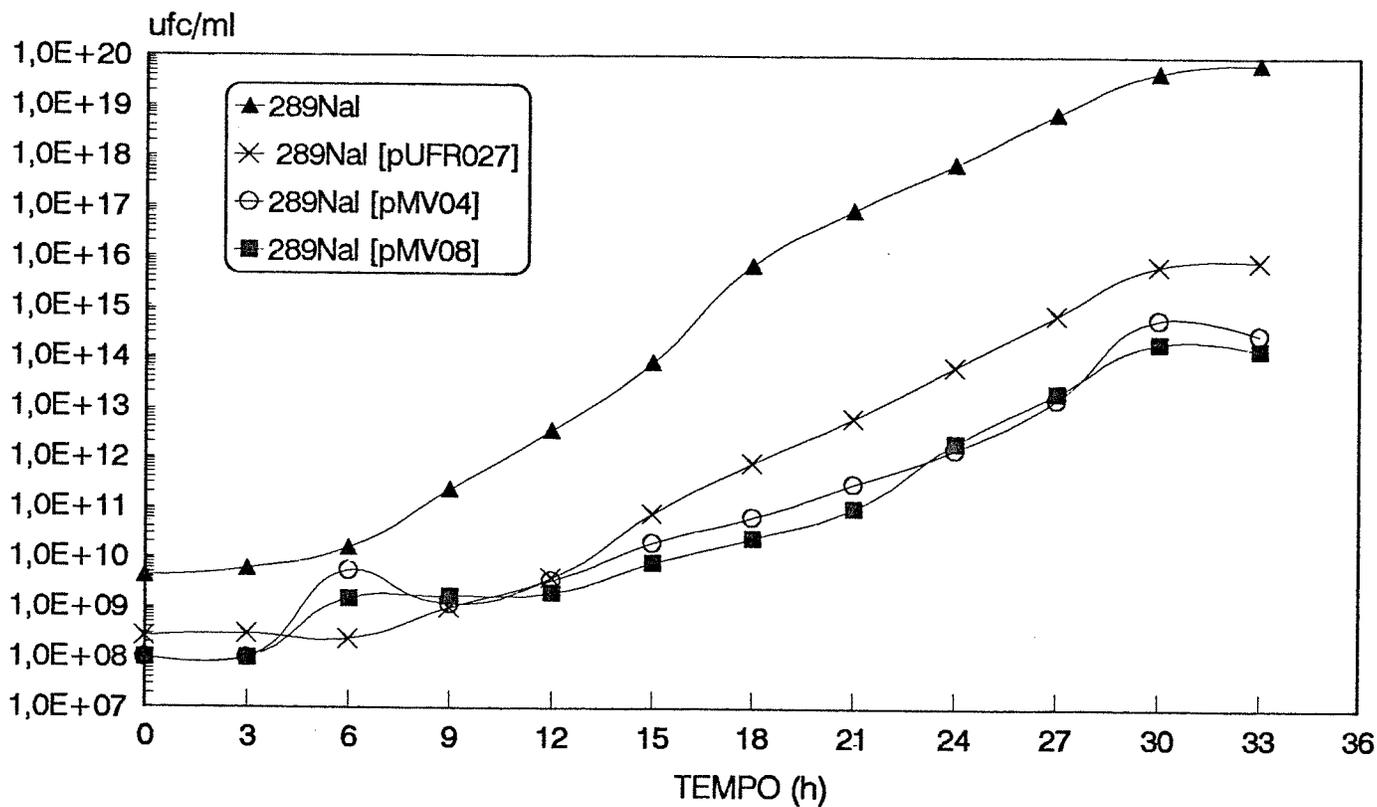


Figura 8: Curva de crescimento com relação ao número de colônias (ufc) das linhagens 289NaI^r, 289NaI^r[pUFR027], 289NaI^r[pMV04] e 289NaI^r[pMV08].

4.2.4. Produção de enzimas extracelulares

Este experimento foi realizado com o objetivo de verificar se os clones 289N[pMV04] e 289N[pMV08] também apresentavam alterações no que diz respeito à produção de enzimas extracelulares, uma vez que, mudanças, com relação à linhagem original, foram observadas nos testes de fitopatogenicidade.

As linhagens selecionadas foram 289NaI^r, 289NaI^r[pUFR027], 289NaI^r[pMV04], 289NaI^r[pMV08], Sm^r e Ca110; estas duas últimas linhagens foram consideradas como controle.

No teste para a produção de amilase a linhagem Ca110 foi considerada o controle positivo. Ela apresentou um halo de cerca de 2,0cm. A linhagem Sm^r também mostrou-se positiva porém apresentou um halo menor comparado com a Ca110. As linhagens 289NaI^r e 289NaI^r[pUFR027] apresentaram um halo menor ao redor da colônia, que comparado com as linhagens anteriores. Os clones 289NaI^r[pMV04] e 289NaI^r[pMV08] não apresentaram halo. O resultado do teste não se alterou mesmo após a lise das células com vapor de clorofórmio e incubação por mais 24 horas.

No teste de atividade proteolítica, Ca110 apresentou resposta negativa, enquanto que Sm^r, positiva. O mesmo resultado do teste anterior ocorreu neste com relação às linhagens 289NaI^r e 289NaI^r[pUFR027] que apresentaram halo reduzido ao redor da colônia, se comparado com as linhagens anteriores, e com relação aos clones testados, esses apresentaram resposta negativa. Após a lise celular o resultado foi o mesmo.

No teste de atividade celulolítica, as linhagens Ca110, Sm^r, 289NaI^r e 289N[pUFR027] apresentaram resposta negativa, entretanto quando essas linhagens foram lisadas, o resultado foi positivo para todas. Quanto aos clones, esses apresentaram resposta negativa antes e após a lise das colônias.

No teste de atividade lipolítica, a linhagem Ca110 apresentou resposta negativa antes e após a lise, a Sm^r apresentou resposta positiva antes da lise e após esta, um halo ainda maior. As linhagens 289Nal^r e 289Nal^r[pUFR027] mostraram resposta positiva de mesmo grau antes e após a lise. Entretanto os clones 289Nal^r[pMV04] e 289Nal^r[pMV08] apresentaram resposta negativa antes da lise e positiva após esta.

Por último, no teste de atividade pectolítica todas as linhagens mostraram-se positivas.

4.3. TRANFERÊNCIA DO pMV04 E pMV08 PARA OUTRAS LINHAGENS DE *Xanthomonas campestris*

Este experimento foi realizado para se verificar o comportamento dos plasmídios pMV04 e pMV08 em diferentes linhagens de *X.campestris*.

Os plasmídios foram transferidos através de conjugação e as linhagens receptoras selecionadas foram: Ca110, Sm^r, 333Sm^r e 479Nal^r. A presença dos plasmídios foi confirmada através da extração de DNA plasmidial e posteriormente essas linhagens foram submetidas à fermentação.

Pela observação dos dados da Tabela 4, com relação a 20 rpm, podemos verificar que o plasmídio pMV08 quando introduzido na linhagem selvagem Ca110 triplicou a viscosidade do caldo, quando comparado com a linhagem original. Também foi verificado tal fenômeno para o plasmídio pMV04, porém com menor aumento na viscosidade (os valores duplicaram com relação à linhagem original).

O aumento de viscosidade não se mostrou muito maior com relação à Sm^r quando o fragmento introduzido foi o pMV04, porém o pMV08 praticamente duplicou esses valores.

A linhagem 333Sm^F apresentou viscosidade extremamente reduzida nas fermentações, entretanto quando os insertos foram introduzidos, ocorreu um aumento de 300 vezes. A viscosidade da linhagem original que foi zero no quadro de leitura passou para 312,5 cps no caso da introdução do pMV04 e 345,83 no caso do pMV08 (Tabela 4 e Figura 9).

Tabela 4 - Efeito do pMV04 e pMV08 na viscosidade (cps) de diferentes linhagens, medida à temperatura ambiente

Linhagens	20rpm	50rpm	100rpm
Ca110	237,50	153,30	106,60
Ca110[pMV04]	404,20	223,30	143,30
Ca110[pMV08]	608,33	328,30	190,83
Sm ^F	225,00	153,33	106,66
Sm ^F [pMV04]	258,33	153,33	101,66
Sm ^F [pMV08]	408,33	220,00	139,20
333 Sm ^F	0	0	0
333 Sm ^F [pMV04]	312,50	173,33	114,16
333 Sm ^F [pMV08]	345,83	191,67	124,16
479 NaI ^F	37,50	30,00	24,17
479 NaI ^F [pMV04]	2,50	0	0
479 NaI ^F [pMV08]	2,50	0	0

Obs: Média de três repetições. A análise estatística dos dados encontra-se no Apêndice II (páginas 108, 109 e 110).



Figura 9: Efeito do pMV08 na linhagem receptora 333Sm^F, com visível aumento de viscosidade em placa.

No caso da receptora 479NaI^r, o caldo desta linhagem não apresentou viscosidade quando comparada com as outras linhagens, porém o pouco que esta produziu decresceu para zero quando os fragmentos foram introduzidos. Este fato foi semelhante ao que ocorreu com a linhagem 289NaI^r; a viscosidade diminuiu quando os fragmentos estavam presentes. Frente à esses fatos, decidiu-se transferir o pMV04 e pMV08 para outras linhagens de *X.campestris* também resistentes ao ácido nalidíxico desde que esta era a característica comum entre ambos (Tabela 5).

Foram selecionadas as linhagens Ca110/NaI^r que apresentou viscosidade aparente em placa, 420NaI^r, medianamente viscosa e 411NaI^r totalmente seca .

Quando os plasmídios foram introduzidos nessas linhagens, essas apresentaram a mesma aparência em placa que a 289N[pMV04] e a 289N[pMV08]: todas "gotejaram" e as colônias ficaram mais translúcidas.

Pela observação na Tabela 5 podemos verificar que dependendo da receptora, os insertos se comportaram de maneira diferente. No caso da Ca110/NaI^r, tanto o pMV04 quanto o pMV08 causaram uma diminuição considerável da viscosidade quando comparados com a linhagem original. Já no caso da linhagem 420NaI^r, o pMV04 apresentou o mesmo comportamento observado na linhagem anterior, decrescendo a viscosidade com relação à linhagem original, porém o pMV08 não causou alteração nenhuma. No caso da linhagem 411NaI^r podemos observar um leve aumento na viscosidade com a introdução de ambos os fragmentos.

Tabela 5 - Interação do marcador ácido nalidíxico (Nal) com pMV04 e pMV08, na viscosidade (cps), medida à temperatura ambiente.

Linhagens	20rpm	50rpm	100rpm
479Nal ^r	37,50	30,00	24,17
479Nal ^r [pMV04]	2,50	0	0
479Nal ^r [pMV08]	2,50	0	0
Ca110.Nal ^r	450,00	236,60	160,00
Ca110Nal ^r [pMV04]	25,00	20,00	15,00
Ca110Nal ^r [pMV08]	12,50	10,00	7,50
420Nal ^r	37,50	31,66	25,80
420Nal ^r [pMV04]	0	5,00	5,00
420Nal ^r [pMV08]	45,80	38,30	29,16
411Nal ^r	0	0	2,50
411Nal ^r [pMV04]	33,30	25,00	20,00
411Nal ^r [pMV08]	12,50	15,00	12,50

Observação: Média de 3 repetições. A análise estatística dos dados encontra-se no Apêndice III (páginas 111, 112 e 113).

4.3.1. Fermentação das linhagens resistentes ao ácido nalidíxico em meio NYGB

As linhagens 289Nal^r[pMV08], 411Nal^r[pMV08] e 420Nal^r[pMV08] foram submetidas à uma nova fermentação, porém utilizando-se um outro meio de cultura, uma vez que, em placas com meio NYGA (meio NYGB sólido), estas linhagens apresentaram viscosidade aparente maior que as linhagens originais. O meio de cultura selecionado foi NYGB acrescido de 2% de sacarose.

Pela observação da Tabela 6 podemos verificar que o resultado obtido com a linhagem 289Nal^r[pMV08] foi semelhante ao obtido pela linhagem original 289Nal^r[pUFR027]. Entretanto as linhagens 411Nal^r[pMV08] e 420Nal^r[pMV08] apresentaram um aumento de cerca de 300 vezes quando comparados com as linhagens originais. As linhagens resistentes ao ácido nalidíxico contendo o pMV08 foram testadas em meio mínimo (MPI) sólido e verificou-se que todas são auxotróficas. Portanto, os resultados obtidos nas fermentações em meio MPI, onde a viscosidade do caldo decrescia a zero, são devido à ausência de nutrientes essenciais às células neste meio.

Assim, podemos concluir que, na realidade, os resultados obtidos são devido à interação do marcador de resistência Nal com o plasmídeo pMV08.

Tabela 6: Viscosidade (cps) do caldo de fermentação das linhagens resistentes ao ácido nalidíxico utilizando-se o meio completo NYGB acrescido de 2% de sacarose.

Linhagens	20rpm	50rpm	100rpm
289Nal ^r [pUFR027]	712,50	326,67	179,17
289Nal ^r [pMV08]	680,00	273,33	150,83
411Nal ^r	0	0	2,50
411Nal ^r [pMV08]	383,33	201,67	130,83
420Nal ^r	0	0	2,50
420Nal ^r [pMV08]	383,33	205,00	141,67

Obs: Média de três repetições. A absorbância foi acertada para 0,70. A análise estatística dos dados encontra-se no Apêndice IV (página 114).

4.4. EFEITO DO PLASMÍDIO pMV08 EM LINHAGENS COM OUTROS MARCADORES GENÉTICOS

Uma vez que os plasmídios pMV04 e pMV08 foram introduzidos em linhagens com marcadores de resistência para estreptomicina e ácido nalidíxico e os resultados obtidos foram muito diferentes, decidiu-se introduzir o pMV08 em outras linhagens derivadas das selvagens utilizando-se outros marcadores genéticos. As linhagens selecionadas foram: 289Sm^r, 333Sp^r, 411Sm^r e 411Sp^r. O plasmídio foi introduzido por eletrotransformação e a presença deste foi confirmada através da extração de DNA plasmidial e hibridização utilizando-se como sonda o fragmento de 3,9kb isolado do pMV08 (dados não apresentados).

Os dados da fermentação dos recombinantes estão relacionados na Tabela 7. Pela observação desta, podemos verificar que o referido plasmídio não causou alteração na viscosidade das linhagens selecionadas.

O recombinante 289Sm^r[pMV08] apresentou valores muito semelhantes à linhagem original 289Sm^r, valores estes que estão de acordo com os observados pelas linhagens 289NaI^r, 289NaI^r[pUFR027] da Tabela 3. Portanto, a partir dos resultados obtidos com o recombinante 289NaI^r[pMV08] e os verificados neste experimento, pode-se sugerir que a diminuição na viscosidade observada deve estar relacionada com o marcador de resistência ao antibiótico ácido nalidíxico.

Através da análise dos dados das tabelas 3, 4, 5 e 7 podemos concluir, também, que quando o marcador de resistência é o ácido nalidíxico, ocorre um decréscimo na viscosidade da linhagem após a introdução do pMV08 (289NaI^r[pMV08], Ca110NaI^r[pMV08], 411NaI^r[pMV08] e 420NaI^r[pMV08]); quando o marcador é estreptomicina, os valores de viscosidade são semelhantes ou superiores à linhagem original (Ca110[pMV08], 289Sm^r[pMV08], Sm^r[pMV08] e 333Sm^r[pMV08]) e quando o marcador é espectinomicina, não ocorre alteração alguma. Esta regra não se aplicaria à

linhagem 411 que foi considerada uma exceção.

Tabela 7: Efeito, na viscosidade (cps), do pMV08 com outros marcadores genéticos.

Linhasgens	20rpm	50rpm	100rpm
289Sm ^r	941,67	418,33	264,17
289Sm ^r [pMV08]	1020,67	446,67	264,67
411Sp ^r	0	5,00	5,00
411Sp ^r [pMV08]	0	5,00	5,00
411Sm ^r	91,67	65,00	49,17
411Sm ^r [pMV08]	116,67	76,67	55,83
333Sp ^r	200,00	146,67	96,67
333Sp ^r [pMV08]	183,83	126,67	84,17

Obs: Média de três repetições. A análise dos dados encontra-se no Apêndice V (páginas 115, 116 e 117).

4.4.1. Teste de fitopatogenicidade

Este teste foi realizado com o objetivo de se verificar se a inibição de resposta de sintomas de doença ocorre apenas na linhagem que contém o marcador de resistência ao ácido nalidíxico contendo o plasmídeo pMV08. A linhagem utilizada foi a 411 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) contendo diferentes marcadores genéticos. Os testes em plantas foram realizados com as seguintes linhagens: 411 (selvagem - controle positivo), 411NaI^r, 411NaI^r[pMV08], 411Sm^r, 411Sm^r[pMV08], 411Sp^r, 411Sp^r[pMV08]. A linhagem 289 (*X.c.pv.manihotis*) foi utilizada como controle negativo e a água como controle da inoculação. Os testes foram realizados em plantas de tomate uma vez que este é o hospedeiro do patovar vesicatoria.

Os sintomas nas plantas de tomate começaram a aparecer no 4^o dia após a inoculação. As linhagens 411, 411Sm^r, 411Sm^r[pMV08], 411Sp^r e 411Sp^r[pMV08] apresentaram os sintomas característicos da doença, enquanto que a 411NaI^r e 411NaI^r[pMV08] mostraram-se não patogênicas.

4.4.2. Produção de enzimas extracelulares

Algumas linhagens contendo o pMV08, utilizadas neste trabalho, foram testadas para a produção de enzimas extracelulares com o objetivo de avaliar se ocorreu alguma alteração após a introdução deste plasmídeo. Os resultados estão ilustrados na Tabela 8.

Pela observação da tabela podemos verificar que a linhagem Ca110NaI^r[pMV08] mostrou resposta negativa em todas as atividades testadas. A linhagem 411NaI^r[pMV08] contendo também o marcador de resistência para o antibiótico ácido nalidíxico apresentou alteração nas atividades amilolítica e pectolítica, com relação à linhagem original, enquanto que no caso das atividades proteolítica e celulolítica, esta apresentou a mesma

resposta que a linhagem original. No restante, quando a linhagem original apresentou atividade enzimática, o seu recombinante, portando o plasmídeo, mostrou resultado semelhante. O mesmo ocorreu em casos onde a linhagem original apresentou resposta negativa.

No caso dos testes para as atividades pectinolítica e celulolítica, todas as linhagens apresentaram resposta, apenas, após a lise celular com vapor de clorofórmio.

Tabela 8 - Efeito do pMV08 nas diferentes linhagens de *X.campestris* na produção de enzimas extracelulares.

Linhagens	Atividade amilolítica	Atividade proteolítica	Atividade celulolítica	Atividade pectolítica
Ca110	+	+	+	+
Ca110[pMV08]	+	+	+	+
Ca110Na ^r	+	+	+	+
Ca110Na ^r [pMV08]	-	-	-	-
Sm ^r	+	+	+	+
Sm ^r [pMV08]	+	+	+	+
289Sm ^r	+	+	+	-
289Sm ^r [pMV08]	+	+	+	-
333Sm ^r	+	+	+	+
333Sm ^r [pMV08]	+	+	+	+
333Sp ^r	+	+	+	+
333Sp ^r [pMV08]	+	+	+	+
411Na ^r	+	-	-	+
411Na ^r [pMV08]	-	-	-	-
411Sm ^r	+	+	+	+
411Sm ^r [pMV08]	+	+	+	+
411Sp ^r	+	+	+	+
411Sp ^r [pMV08]	+	+	+	+

4.5. SUBCLONAGENS DO pMV08

4.5.1. Obtenção e caracterização dos subclones

O fragmento do pMV08 de aproximadamente 3,9kb após digestão dupla de *KpnI* e *EcoRI* libera dois fragmentos, um de aproximadamente 2,3kb e outro de 1,6kb. Esses fragmentos foram subclonados no vetor pUFR027 para posteriormente serem introduzidos novamente em linhagens de *X.campestris* a fim de se observar se a região responsável pela alteração de viscosidade está contida num dos dois fragmentos. Eles foram denominados pMV2,3-8 e pMV1,6-8 (Figura 10).

Os subclones foram introduzidos na linhagem 333Sm^r, por eletroporação. Esta linhagem foi selecionada porque apresentou aumento na viscosidade de cerca de 300 vezes (Tabela 4) quando o fragmento inteiro de 3,9kb foi introduzido, funcionando, portanto, como um controle positivo. As colônias contendo o pMV2,3-8 e pMV1,6-8 mostraram-se totalmente secas em placas e portanto, não foram realizados testes de fermentação. Uma hipótese para este fato seria a de que o sítio de *KpnI* que liberou os referidos fragmentos possa conter uma região importante para a resposta de alteração na viscosidade.

Foi realizado um experimento de hibridização a fim de se confirmar a presença dos plasmídios pMV2,3-8 e pMV1,6-8 na linhagem receptora 333Sm^r. Utilizou-se como sonda o fragmento do pMV08. Os resultados estão ilustrados na Figura 11. Pela observação da figura podemos verificar que a presença do pMV08 e pMV2,3-8 foi confirmada, mas a linhagem contendo o pMV1,6-8 não apresentou hibridização (coluna e). Um outro experimento foi realizado e a presença deste foi confirmada (dados não apresentados)

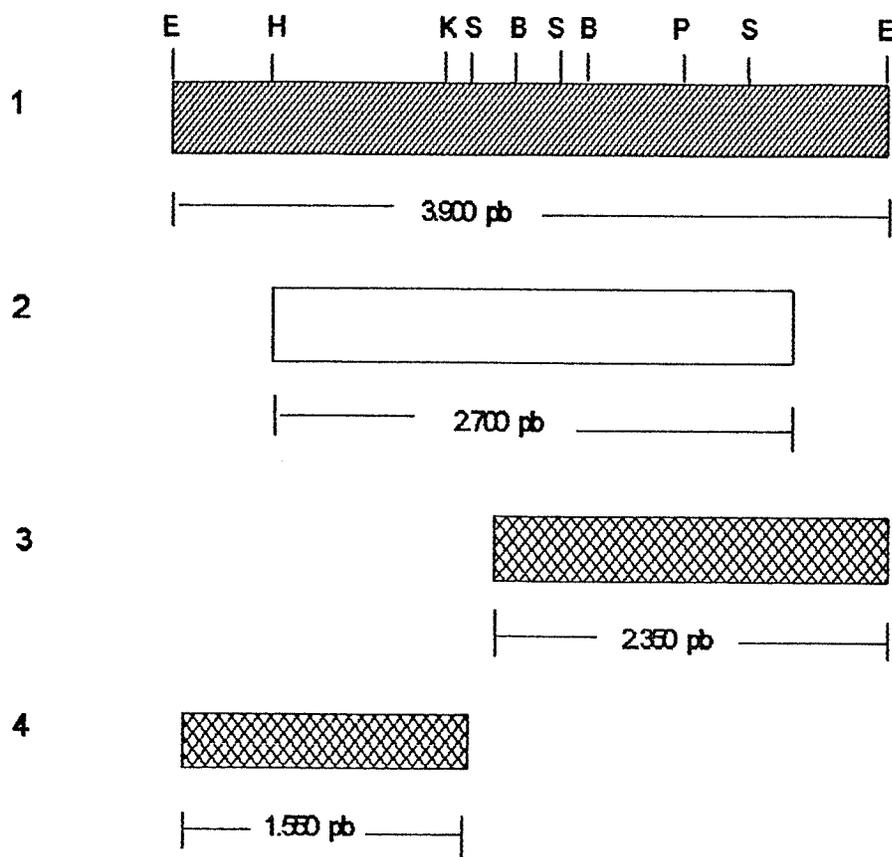


Figura 10: 1. Mapa de restrição do fragmento de 3,9kb do pMV08

E: *EcoRI*; H: *HindIII*; K: *KpnI*; S: *SacII*; B: *BamHI* e
P: *PstI*

2. Sequência de 2,7kb

3. Subclone pMV2,3-8 obtido por digestão com *KpnI*

4. Subclone pMV1,6-8 obtido por digestão com *KpnI*

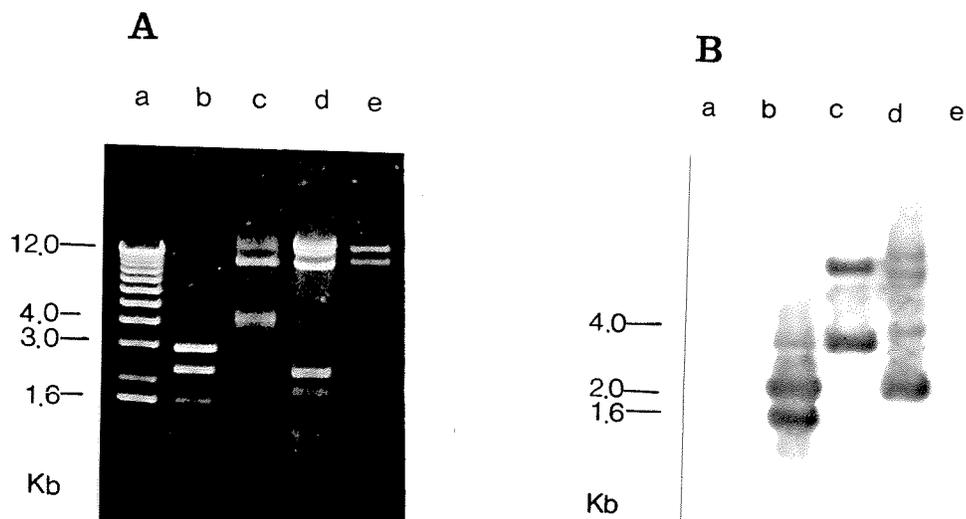


Figura 11: A) Eletroforese em gel de agarose 0,8% da linhagem 333Sm^F contendo os diversos plasmídios.

B) Hibridização das linhagens contendo os diversos plasmídios.

a) ladder

b) controle da sonda digerido com *KpnI* e *EcoRI*

c) 333Sm^F[pMV08] digerido com *EcoRI*

d) 333Sm^F/pMV2,3-8 digerido com *KpnI* e *EcoRI*

e) 333Sm^F/pMV1,6-8 digerido com *KpnI* e *EcoRI*

4.6. SEQUENCIAMENTO

Os fragmentos obtidos dos clones 289Nal^r[pMV04] e 289Nal^r[pMV08] foram subclonados no vetor pBKS⁺ e denominados pBKS04 e pBKS08, respectivamente.

Decidiu-se sequenciar somente o clone pBKS08 utilizando-se os clones obtidos das deleções com exonuclease III (Henikoff, 1987).

4.6.1. Deleção unidirecional do clone pKS08

No primeiro experimento de deleção, foram retiradas 25 alíquotas a cada 1 minuto e a reação foi realizada a 30°C com o objetivo de se obter deleções de aproximadamente 200 bases. Após tratamento com Klenow, ligação e transformação, algumas colônias foram selecionadas, o DNA plasmidial foi extraído e digerido com a enzima de restrição *Xba*I para linearizar o plasmídeo pBKS⁺ e verificar o tamanho dos fragmentos.

Foram selecionados 14 clones para sequenciamento em gel de poliacrilamida 5% e 6%. Foram sequenciados aproximadamente 2,0kb do total de 3,9kb e portanto foi realizado um novo experimento de deleção (Figura 12).

A quantidade de DNA utilizada e todo o procedimento foi realizado seguindo-se as mesmas condições do primeiro experimento, porém, no sentido oposto, utilizando-se o "primer direto", com o objetivo de se alcançar os 2,0kb já sequenciados.

Das 25 alíquotas retiradas, foram selecionados 11 clones para sequenciamento em gel de poliacrilamida 6% (Figura 12).

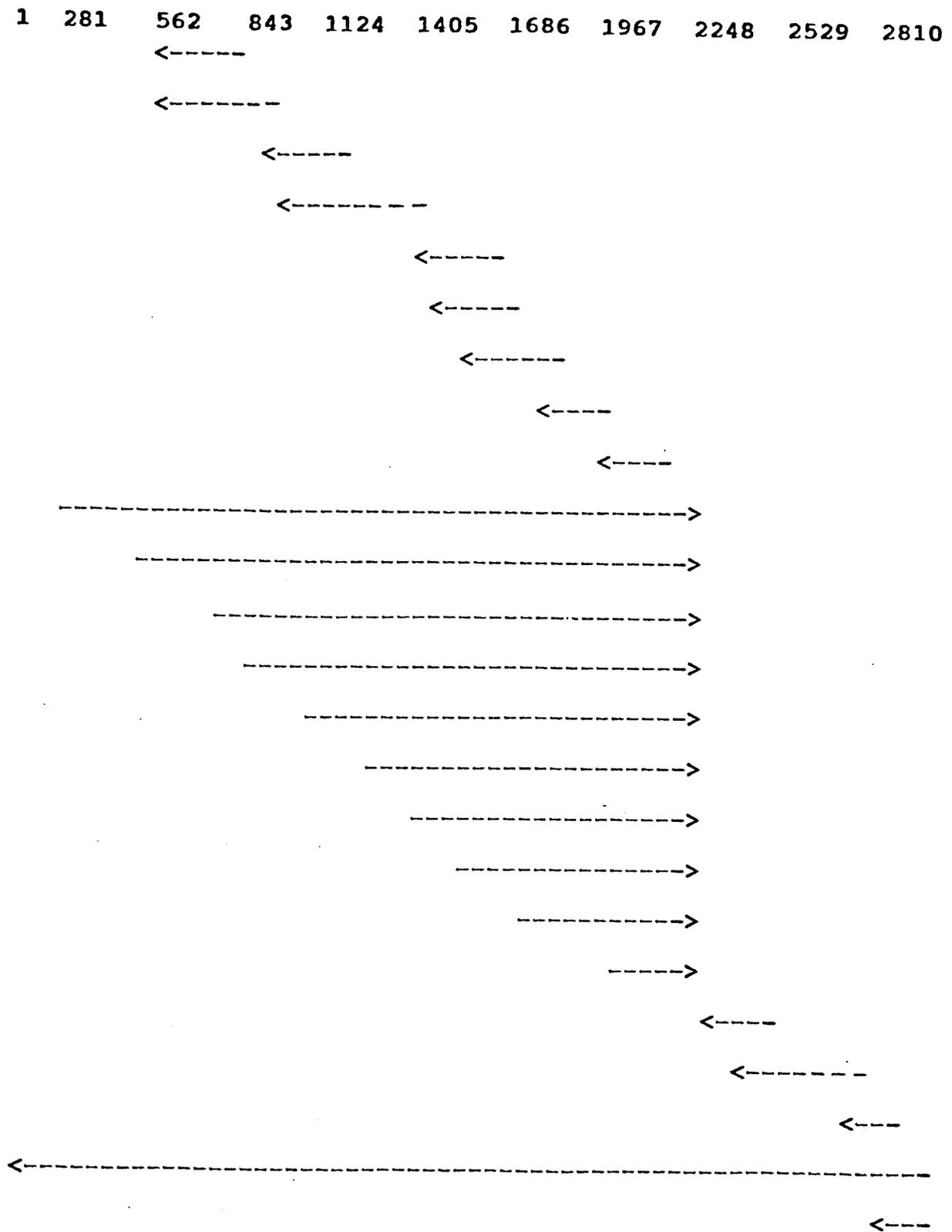


Figura 12: Extensão dos subclones escolhidos para sequenciamento. As setas indicam a orientação das fitas.

4.7.2. Análise da sequência do pKS08

Dos subclones sequenciados, foi obtida uma sequência contínua de 2,7kb (Figura 13) do fragmento de 3,9kb. Embora tendo sido sequenciados, não foi possível ligar os dois primeiros clones de ambos os experimentos de deleção ("primer direto" e "primer reverso"), que corresponderiam ao início e término da sequência. Eles totalizariam os 1200 pares de bases restantes.

A edição e análise da sequência foi realizada através dos programas DNASIS - Pharmacia e ESSE v.1.04.

Uma análise desta sequência revelou que esta possui um conteúdo de CG de aproximadamente 68%, que esta de acordo com relatos de literatura sobre sequências de DNA de *X.campestris*.

A análise revelou, também, três possíveis fases de leitura (ORFs), com códon de terminação TGA com 2181 pares de bases. A primeira fase de leitura, tem o códon de iniciação ATG com 966 pares de bases (pb). O sítio de ligação do ribossomo 5'-GGTG-3' está a -6pb "upstream" do ATG, a região promotora -10 [5'-GACAA-3' (921-925pb)] está a -40pb e a -35 [5'-TTGTG-3' (891-895pb)] a -70pb do códon ATG. Há, também, a possibilidade da região -10 ser 5'-TTGTG-3' (891-895) a -70pb do ATG e a região -35 ser 5'-TGTCAA-3' (847-853) a -112pb do ATG. Estas sequências alternativas surgiram da comparação com outras sequências já descritas em *X.campestris*. Esta região codificaria uma proteína de aproximadamente 43,76KDa.

A segunda possível fase de leitura possui o códon de iniciação ATG com 870pb. O sítio de ligação do ribossomo (5'-TTGT-3') está a -2pb "upstream" do ATG; a região de -10 [5'-CCAA-3' (850-853)] está a -16pb e a região -35 [5'-TGGT-3' (824-827)], a -42pb do códon de iniciação ATG. A proteína codificada teria aproximadamente 47,16KDa.

A terceira, e última, possível fase de leitura tem como códon de iniciação CTG com 834pb. A -5pb está o sítio de ligação do ribossomo 5'-TGGTG-3'; a região promotora -10 [5'-CATG-3' (816-819)] a -14pb e a -35 [5'-TGTGGA-3' (753-758)] a -75pb do códon ATG.

Esta sequência foi comparada com sequências depositadas nos bancos de dados EMBL, Gen Bank e DDBJ e verificou-se que a homologia encontrada é muito pequena. Há uma homologia de 75% dentro de uma sequência de 49 pares de bases com o vírus Herpes simples tipo 2; uma homologia de 85% dentro de uma região de 35 pares de bases com uma histona de trigo; uma homologia de 64% dentro de uma região de 71 pares de bases com um receptor adrenérgico humano e uma homologia de 77% dentro de uma região de 44 pares de bases com K-ATPase de galinha. Não foi detectada nenhuma homologia com genes já descritos de *Xanthomonas campestris*.

5'

01 TCCACCCTGTCCACCCGGCTGCGCGACGGTCGGGCTGGATCTGGGCAGCA 50
51 TCGGTCTGATCAGCCTGGCAAGCTTTTTTTACCTGCTCAAGTTCCTGTGG 100
101 GCTCCGTGATCGACCGCTATGCGTTCCCGATCAACCGCGTTTCTGGGCCG 150
151 CCGGCGTTCCTGGCTGCTGGTCTCGCAACTCGGCGTCACTGCCGGGCCTG 200
201 TTCGCACTGGCGTTTTCCGCCGCCCGGACCATGAAGTGTTACCGGCCT 250
251 GGTCGCCTGGGTTGCTGGTTCGCCTCGTTCTGGGGCGCCACGCAGGATTC 300
301 GGTGGTGGATGCCTACCGGCATCGAAATTGACCCCAGAATACCGCGCCAG 350
351 GCCGGCGACTTGCCGGACCTACACCCTGGGCTATCGGATCGGCCTGATC 400
401 CTCGGTGGCGCCGGGGCCGTGTATCTGGCCGAATACCTCAACTGGACTTC 450
451 GGCGTACCTGGCCATGTCGGCCGCCTGATGCCTGCTGCCGATCATCAACC 500
501 ACCCTGGTATGCCGGCGAGCCGGACCGGCCGTGGTCACGGTGGTGCCTGC 550
551 ACTCGCAGCTAGCCCGGCGCACTTCTGGACGCCCATTTTCAGTTTCTTCTC 600
601 CAGCAATGGGCTGGCGCTGGGCATCGTCCTGCTGGCATTGTGCGGCCTGT 650
651 TCAAGTTTCCGGATCAGGTGATCGGCGTGATGGCCGGGCCGTTCTATCTG 700
701 GATTCGGGCTACACCAAGGCCGACATCGCCACGGTGTCCAAGCTGTTCCG 750

Figura13: Sequência de 2,7kb do inserto do pMV08.

751 CGTGTGGATGGGCATCGTCTTCGCGTTCGCGGCGGTGCGGCGGTGGCGGC 800
 -35
 801 GTTCGGCTTCCGTCGCATGCTGCTGGTGGCCGCCTGGGCGTGGCGCTGTC 850
 -10 ORF3
 SD
 851 CAACCTGGCGTTTTTGTGATGGCGCAGAACCCCTGGCAAATTGTGGGCGT 900
 -10 ORF2 -35
 SD
 901 TCTACGCCGCACTCAGTGCCGACAATCTGTTCCAGGGGTTGCGCCGTACC 950
 -10
 951 GTGCTGGTGGCCTTCATGTCATCGCTGACAAATCGCAATTCACCGCCAC 1000
 ORF1
 SD
 1001 CCAGTACGCCTTGCTGGTGTGCTGGCCAATTTGCCGGGTAAATTCGCTG 1050
 1051 GCGGTGTGTCCGGTTCCCTGGTCGAGGCCACCTCCTACAGCACCTTCTTC 1100
 1101 ATCCTCAGCCGCCCTGACCGTGGTTCACGCTGGCCCTGCTTGCTGCTGGC 1150
 1151 TGTGGCCGCGGCTGGATGCCCGCGATGGGCGCCCGGATTGAAACGGCCGC 1200
 1201 CCAGGTGTGTCGATGAATGCAGGCGGGGCAGCGCAGTGACGAGGCAGGGC 1250
 1251 ATGACCGATCTGGTGTGCGGGACATCGATCCATTGCTGGTGGACAGGAT 1300
 1301 CCGTCGCATCTCCGTCGGCTCGCGGCTGGACCCAGCATCAGACCGTGATG 1350
 1351 CATCTGCCTCGAACAGGGCCTGTTCCCAGCGAATACGAAGTCACCGGCGG 1400
 1401 CCTGCAACACCCGGAAGTCGATGCCCTGGCCGAAGCGATTGCCGGCGCTC 1450
 1451 AAGGCGCTGCCGGCGGGGAATAGCCCGTAGCTGCAAACGGTCAGGCCACG 1500
 1501 CGCTGCCTCGCGTGCGAATCCATCCGGCGCGAGGATGTTGCGACTGCGGG 1550

Figura 13: Continuação

1551 CGCTCGCAACTGATCCAGGCCTGTCACGCCGGATGGATCGCTCCCAGCAA 1600
1601 CCGCGGCCCGGCCGCCCCGGTCACCGACGGCAGATTGGCGGCCCGGCCTG 1650
1651 CGAGCAGCTGCCGCGGCCAACCATGCGAACCCCATCGCCTCCAGATAGTC 1700
1701 CGGATCCAGCCCATGCGCGCGCTGGATTCCACCACCACGCCCGGCAGTCG 1750
1751 CGCCGCCAGTCGTGCCATCAATACCGGATTGCGCACCCCGCCACCGCACA 1800
1801 CCAGCACCCGGCGGGTATCGGGCAGCCGACGCAACGCGTTCGGCGACACT 1850
1851 GGATCGGTCAGTTCGAGCAGGGTCGCCTGCACATACGGCCGACAGACAGCG 1900
1901 CCACGTCTCCAGCGACCGCATCGCCCGCATCGCCAGTCCAGATGGAAC 1950
1951 TGCTCGCGCCCGGTGCTCTTGGGCGCGCCAGCGCAAACCACGGGTTCGGCC 2000
2001 AGGCAACGCCTGCAGCAGTGGGGTATCGACGGCCGCTGGCGGGCGAACGCA 2050
2051 CCGTCGGGCATCGAACGCCGTGCGCGATGCTGCTGGCACCAGCTGTCCAG 2100
2101 CAATGCATTTGGCTGGCCCCGGTATCGAAGCCCAGCGAGCCATCGCGCGGGA 2150
2151 TCAGCGTCAGGTTGCCGATGCCGCCAGATTGAGCACCGCGCGGTCTTCA 2200
2201 TCGCCCGTGCCCAGCATGGCCAGATGAAAGCCGGGCATCAGCGGCGCGCC 2250
2251 CTGACCGCCGGCGACCACATGCGACGGCGAAATCGGCCACCGTGGTGGAT 2300
2301 GCCGGTGTGCTCGGCAATCCGGCTGCATCGCCGATCTGCCAGGTAAACCG 2350
2351 GGGATCGGCCTTGGCGATGCCGAATGGTCTGCCCATGCGAGCCGATCGCA 2400

Figura 13: Continuação

2401 CGAAGCCCCACGCGCGATCCGGTGTGCGGGATCAGTTGATTGCCGCGGCC 2450
2451 GCAAAGCCAGCCCCACCTGCGCATCCAGGTGTCCAACGCATCGATGGCGA 2500
2501 TCACGTCGGCGCCCTGGCCCAGCATCACCAGTGTGTCGCAGTCGCGGCTC 2550
2551 CCAGGCCACGGTGGTGCCGGCAACCAGTTGCCAGCGGCGATGGCTGTCAT 2600
2601 CGGCAAAGCACCAGTGGGCCATCGATGCCTGCGGGCGCTGGTGCCCGACAT 2650
2651 CAGGCCAGGTAGAGCGGGCGATTCCAGGTGTTCCGGTACCAG 2693

3'

Figura 13: Continuação.

5. DISCUSSÃO

5.1. Isolamento e caracterização dos clones de EPS

O cruzamento do banco genômico de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* com a linhagem 289Nal^r (*Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*), a qual foi previamente identificada como uma das melhores linhagens disponíveis no laboratório quanto à produção de goma xantana, permitiu a identificação de dois clones distintos com produção de goma alterada. Esses clones, denominados pMV04 e pMV08 apresentaram insertos de 2,5 e 3,9Kb respectivamente.

A introdução desses fragmentos em diferentes linhagens de *X.campestris* causou alterações na viscosidade dependendo do patovar utilizado e principalmente do marcador genético da linhagem receptora. Na linhagem Ca110, por exemplo, os valores de viscosidade duplicaram no caso da introdução do pMV04 e triplicaram no caso do pMV08. Na linhagem 333Sm^r o aumento observado foi de 300 vezes e nas linhagens receptoras 289Sm^r e 411Sm^r, ambas resistentes à estreptomicina, os valores de viscosidade foram semelhantes à linhagem original.

O aumento da produção de goma xantana através da clonagem de plasmídios contendo genes relacionados com a biossíntese desta goma já foi reportado por alguns autores. Thorne *et al.* (1987) encontraram alguns clones com aumento de 20% na produção de xantana. Aumentos de 10% na produção e 45% no conteúdo de piruvato, componente importante para a viscosidade de goma xantana, foram encontrados por Harding *et al.* (1987) e aumentos similares (10-15%) na produção foram obtidos por Tseng *et al.* (1992). Entretanto, ainda não foram registrados aumentos na viscosidade como os encontrados no presente trabalho, por exemplo, com a linhagem 333Sm^r.

Foi também verificado um caso de redução drástica da viscosidade com a linhagem receptora 289Nal^r, resistente ao antibiótico ácido nalidíxico, contendo o plasmídeo pMV04 ou pMV08. Outras linhagens receptoras, resistentes ao ácido nalidíxico foram também testadas com esses plasmídios e os resultados obtidos mostraram, de forma geral, que não ocorreram alterações na viscosidade quando as linhagens originais apresentavam baixa viscosidade. Entretanto, no caso da linhagem Ca110Nal^r, também considerada uma boa produtora de goma xantana, o decréscimo na viscosidade observado foi semelhante ao da linhagem 289Nal^r.

As linhagens 289Nal^r[pMV08], Ca110Nal^r[pMV08], 411Nal^r[pMV08] e 420Nal^r[pMV08] resistentes ao ácido nalidíxico e contendo o pMV08 foram testadas em meio mínimo (MPI) e verificou-se que todas eram auxotróficas, enquanto que as linhagens originais 289Nal^r, Ca110Nal^r, 411Nal^r e 420Nal^r eram prototróficas.

Quando essas linhagens foram submetidas à fermentação utilizando-se um meio completo (NYGB acrescido de 2% de sacarose) o aumento de viscosidade nos recombinantes, originados de linhagens consideradas secas ou medianamente secas, foi muito semelhante ao observado com a linhagem 333Sm^r (aumento de 300 vezes após introdução do pMV08). Ou seja, se o comportamento do pMV08, com relação ao aumento de viscosidade, foi o mesmo, o decréscimo abrupto observado inicialmente pelos recombinantes resistentes ao ácido nalidíxico (Nal) foi devido a composição do meio de cultura utilizado na fermentação.

A possibilidade da inibição da expressão de genes exógenos introduzidos em linhagens resistentes ao Nal foi descartada a partir de relatos de literatura onde as mesmas linhagens de *X.c. pv. manihotis* foram utilizadas para a clonagem do gene de α -amilase de *Bacillus subtilis* e houve expressão desse gene (Stripecke *et al.*, 1989 e Pimenta *et al.*, 1991).

Os resultados indicam, portanto, uma possível interação do tipo negativa entre o plasmídio pMV08 e o marcador de resistência Nal.

O ácido nalidíxico é uma droga que afeta a atividade da DNA girase, responsável pelo superenovelamento negativo do DNA. Acarreta também efeitos pleiotrópicos nos processos celulares tais como a replicação do DNA, transcrição e recombinação (Dorman, 1991). Entretanto, Shuman e Schwartz (1975) verificaram que, em células de *E. coli* K-12, 50 µg/ml de ácido nalidíxico (Nal) inibiram a síntese de maltodextrina-fosforilase em 70%, síntese do receptor do fago λ em 80% e a β-galactosidase em 40% e concluíram que o Nal atua como um agente intercalante, podendo inibir a transcrição de alguns genes tais como os do sistema da maltose. Os experimentos revelaram, também, que o Nal não interfere diretamente no transporte da maltose e sim, evita a indução do sistema de transporte desta.

De forma semelhante, Sanzey (1979) verificou que o Nal inibiu a expressão de genes do operon maltose, lactose, galactose e o gene da triptofanase, todos sensíveis a repressão catabólica. O trabalho propõe que os promotores são alvos da ação do Nal e dependendo de qual promotor é utilizado, a expressão do gene *lac Z* é inibida, aumentada ou não é afetada.

Entretanto, apesar de serem conhecidos alguns exemplos de interferência do Nal com a expressão gênica, o seu mecanismo de ação ainda não está esclarecido.

A maioria das linhagens obtidas foram testadas também para a produção de enzimas extracelulares e verificou-se que somente ocorreram alterações nos recombinantes resistentes ao ácido nalidíxico contendo o pMV08.

A linhagem 289Nal^r contendo os plasmídios pMV04 ou pMV08 foram testadas em plantas de mandioca, hospedeiro do patovar *manihotis* e em plantas de tomate, hospedeiro do patovar *vesicatoria* e verificou-se que estes recombinantes também eram não patogênicos.

Os resultados gerais de viscosidade, produção de enzimas extracelulares e patogenicidade reforçaram a hipótese de uma interação negativa do marcador Nal (ácido nalidíxico) com o plasmídeo pMV08, pois a presença deste causou alterações múltiplas nessas linhagens.

Com base nos dados obtidos sugere-se que o plasmídeo pMV08 do presente trabalho, pode estar envolvido com o sistema de regulação da biossíntese do exopolissacarídeo do tipo positiva, onde o produto da proteína regulatória exógena causaria um aumento na produção de goma xantana que, dependendo da linhagem receptora aumentaria sua produção normal a níveis superiores, como observado para as linhagens Ca110 e Sm^r e a níveis muito superiores como no caso da linhagem 333Sm^r, 411Nal^r e 420Nal^r. Esta proteína funcionaria como ativadora do sistema que controla a síntese de goma xantana. Se a bactéria possui um mecanismo de controle da produção de goma, a proteína exógena, poderia, por um mecanismo ainda desconhecido, ativar o sistema. Aumentos na produção de goma xantana, a partir do aumento no número de cópias de determinados genes já foram relatados por Daniels *et al.* (1984) e Tang *et al.* (1989).

No caso das linhagens 289Nal^r e 289Sm^r sugere-se que não foram observados aumentos na viscosidade após introdução do pMV08 devido à uma possível saturação do meio de cultura ou da própria célula em produzir mais goma, pois os níveis obtidos com as linhagens originais já foram muito superiores aos observados com as demais linhagens.

5.2. Análise da sequência do pKS08

A análise da sequência de 2693 pares de bases do pMV08 revelou um conteúdo de CG de 66,4%. O alto conteúdo de CG já foi relatado em *Xanthomonas campestris* por Liu *et al.* (1990) de 68% e por Hu *et al.* (1993), de 63,4%.

As possíveis fases de leitura (ORFs) citadas no presente trabalho foram designadas como possíveis devido ao fato de não ter sido encontrado em *X.campestris* sequências consenso. Um levantamento de genes de *X.campestris* foi realizado a partir de genes, desta bactéria, já catalogados no banco de dados do EMBL e verificou-se que tanto as sequências promotoras -10 e -35 como os sítios de ligação do ribossomo, variam muito entre os descritos.

A possibilidade da 3ª fase de leitura apresentar como códon de iniciação CTG, foi reforçada pelo relato de Dums *et al.* (1991) que identificaram dois genes, dentre cinco, responsáveis pela secreção de proteínas em *X.campestris pv.campestris*, possuindo este códon de iniciação.

O início das três ORFs apresentadas (ATG na posição 966, 870 e 834) estão muito próximas do sítio de Kpn I (posição 950 pares de bases), reforçando os resultados obtidos com as subclonagens. Os dois subfragmentos, obtidos a partir da digestão com Kpn I, apresentaram inativação dos efeitos apresentados pelo pMV08, indicando que este sítio, situado próximo as ORFs, deve ser importante para a expressão da atividade gênica.

6. CONCLUSÕES

1. Foram identificados dois plasmídios distintos, pMV04 e pMV08, que quando introduzidos em diferentes linhagens receptoras de *Xanthomonas campestris* causaram aumentos na viscosidade de até 300 vezes.

2. Os plasmídios pMV04 e pMV08 apresentaram uma interação do tipo positiva em linhagens receptoras resistentes à estreptomicina, aumentando a viscosidade dessas ou mantendo-a níveis semelhantes a linhagem original.

3. Os plasmídios pMV04 e pMV08 apresentaram interação do tipo negativa quando a linhagem receptora apresentava marcador de resistência ao ácido nalidíxico. Todos os recombinantes contendo o pMV08 mostraram-se auxotróficos, não patogênicos, deficientes para a produção de enzimas extracelulares e produção de EPS. Esta última característica pode ser revertida utilizando-se um meio completo nos experimentos de fermentação, onde linhagens consideradas secas ou medianamente secas apresentaram um aumento na viscosidade de cerca de 300 vezes.

4. O sequenciamento de aproximadamente 2,7kb do plasmídio pMV08 apresentou três possíveis ORFs que codificariam uma possível proteína envolvida com a alteração na viscosidade observada. Não foi detectada homologia com genes de *X.campestris* já descritos em literatura.

7.RESUMO

Xanthomonas campestris é uma bactéria fitopatogênica à diversas espécies de plantas e produtora de um exopolissacarídeo conhecido comercialmente como goma xantana. Com a finalidade de identificar genes envolvidos com a produção da goma, foi efetuado um cruzamento da linhagem 289 Nal^r (*X. campestris* pv. *manihotis*), considerada uma das melhores produtores de goma, com o banco genômico da linhagem selvagem 317 (*X. campestris* pv. *vesicatoria*). O banco foi construído no vetor de clonagem pUFR027, com fragmentos digeridos com *EcoRI*. Foram isolados 2 clones, caracterizados preliminarmente como produtores de uma goma distinta, que apresentava "gotejamento" na placa. A análise desses clones levou ao isolamento de dois plasmídios distintos, pVM04 e pVM08, que apresentaram insertos de 2.8 e 3.9 kb, respectivamente. Os clones foram submetidos à fermentação em meio MPI com sacarose (2%) como fonte de carbono e foi verificado um decréscimo abrupto na viscosidade, em relação à linhagem original. Os plasmídios foram transferidos por conjugação triparental ou por eletrotransformação para outras linhagens, pertencentes a patovares distintos, produtores e não produtores de goma e as novas linhagens recombinantes foram submetidas à fermentação. Os resultados obtidos mostraram que houve variação na viscosidade dependendo da linhagem receptora e mais especificamente do marcador de resistência. Foram utilizadas no total 4 linhagens resistentes ao ácido nalidíxico (479Nal^r, Ca110Nal^r, 411Nal^r e 420Nal^r) e todas apresentaram decréscimo na viscosidade (níveis próximos de zero) após a introdução do pMV08. Entretanto quando essas linhagens foram testadas em meio mínimo verificou-se que todas tornaram-se auxotróficas e que, portanto, o decréscimo na viscosidade a níveis próximos de zero foi devido a composição do meio de cultura utilizado. Quando o marcador de resistência utilizado foi estreptomicina (linhagens Sm^r, 289Sm^r, 333Sm^r e 411Sm^r) os valores de viscosidade foram equivalentes ou superiores à linhagem original

(até 300 vezes). O marcador de resistência à espectinomicina não apresentou alterações assim como as linhagens pertencentes ao patovar *vesicatoria*, que é o patovar original dos insertos. Os resultados obtidos indicam de forma geral, a possibilidade de que os insertos clonados estejam envolvidos com a produção de uma proteína regulatória de ação positiva para produção da goma. Essa ação positiva foi indicada principalmente pela indução na produção da goma em uma linhagem não produtora (linhagem 333 Sm^r) e aumento em outras duas linhagens já produtoras (Ca110 e Sm^r). Os resultados foram entretanto, diferentes quando a linhagem receptora apresenta resistência ao ácido nalidíxico. Há claramente uma interação negativa desse marcador com os insertos dos plasmídios pMV04 e pMV08, que acarretou auxotrofia nessas linhagens, levando à uma redução absoluta de viscosidade com relação a linhagem original. A interação negativa para produção de goma, pode entretanto, ser revertida usando se um meio de fermentação completo e verificou-se que o aumento na viscosidade, em linhagens consideradas secas ou medianamente secas, foi semelhante ao observado na linhagem 333Sm^r (aumento de 300 vezes). Foi também observado bloqueio de outros genes endógenos, como aqueles para produção de enzimas extracelulares (amilase, celulase, pectinase e protease) e de patogenicidade, foram também afetados. Apesar da constatação dessa interação negativa, o mecanismo pelo qual isso ocorre não é claro. Sabe-se que a resistência a ácido nalidíxico está envolvida com a DNA girase e que alterações na sua atividade pode afetar a expressão de alguns genes (Dorman, 1991).

A possibilidade uma proteína sendo sintetizada pelo inserto do pMV08 foi averiguada através do sequenciamento de uma região de 2.7 kb. O fragmento apresentou uma alta frequência de CG (66.4%) e três possíveis fases de leitura, sendo duas com códon de iniciação ATG e uma com CTG. Foram detectados possíveis sequências promotoras a -35 (TTGTG, TGTCAA, TGGT ou TGTGGA), a -10 (GACAA, TTGTG, CCAA ou CATG) e sequências Shine-Dalgarno (GGTG, TTGT ou TGGTG). A comparação dessa sequência com o banco de dados do EMBL, Gen Bank e DDBJ, não

indicou homologia com nenhuma sequência conhecida em *X. campestris*. Há uma pequena região compreendendo 49 pares de bases que indicam uma homologia de 75% com o vírus Herpes simples tipo 2, uma segunda região com 35 pares de bases que apresenta homologia de 85% com uma histona de trigo, uma terceira região que compreende 71 pares de bases com 64% de homologia com um receptor adrenérgico humano e uma quarta região compreendendo 44 pares de bases com 77% de homologia com K-ATPase de galinha.

8. Summary

Xanthomonas campestris is the causal agent of various diseases in different species of plants and the producer of an exopolysaccharide (EPS) known as xanthan gum. To identify genes related to the production of xanthan gum, an *in masse* conjugation of the strain 289 Nal^r (*X. campestris* pv. *manihotis*), a good producer of EPS, was carried out with a wild type genomic library of strain 317 (*X. campestris* pv. *vesicatoria*). The genomic library was constructed using *EcoRI*-digested total DNA cloned in pUFR027 cloning vector. Two clones, characterized by the running of gum in solid plates were isolated. Analysis of the plasmids, pVM04 and pVM08, showed inserts of 2.8 and 3.9 kb, respectively. Both clones were used in fermentation tests in MPI medium containing 2 % of sucrose as carbon source and the results showed a drastic reduction of viscosity.

The pVM04 and pVM08 were transferred to other strains belonging to different pathovars (*campestris*, *glycines* and *vesicatoria*), containing different antibiotic resistance genes and producer and non producers of EPS. The new strains were fermented and the results were variable depending on the recipient strain or more specifically, on the antibiotic resistance gene. Four Nal^r recipient strains showed the same decrease in the viscosity as shown by the former strain 289 Nal^r however when the recipient strain was Sm^r (4 strains tested) the viscosity values were the same or increased up to 300-fold. The Sp^r marker showed no alteration in the EPS production as well when the recipient strain was from pv. *vesicatoria*. The results indicated in general that the cloned inserts were similar in function and that they might produce a regulatory positive protein. This positive action was indicated by the induction or increase of EPS in non producer (333) or low producer EPS strains. The results however were different when the recipient strain was Nal^r. There was a negative interaction of this marker with the cloned inserts induced auxotrophy and therefore an abrupt reduction in the viscosity. The viscosity could be

reverted using a complex medium in the fermentation process. There was also inhibition of other endogenous characteristics such as extracellular enzyme production (amylase, cellulase, pectinase and protease) and pathogenicity. The mechanism of such negative interaction is not clear although it is known that the resistance to nalidixic acid is related to gyrase subunit and alterations in this enzyme could affect transcription of some genes (Dorman, 1991).

The sequencing of 2.7 kb from pVM08 showed a high content of CG (66.4%) and three putative ORFs, two with ATG initiation codon and one with CTG. The putative promoter sequences TTGTG, TGTCCAA, TGGT or TGTGGA was located at -35 position, GACAA, TTGTG, CCAA or CATG at -10 position and Shine Dalgarno sequences (GGTG, TTGT or TGGTG) at -4< position. This sequence showed no homology to other known sequences in *X. campestris*. A small region of 49bp showed 75% of homology with herpes simplex virus type 2, a second region of 35bp showed 85% of homology with wheat histone gene, a third region of 71bp showed 64% of homology with human alpha-2 adrenergic receptor and a fourth region of 44bp showed 77% of homology with chicken K-ATPase.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N., 1989. *Plant Pathol.* 3rd Ed. Academic Press, Inc. San Diego, California.
- ATKINS, D.T.; BARBER, C.F. e DANIELS, M.J., 1987. Transformation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* with plasmid DNA. *J. Gen. Microbiol.*, 133: 2727-2731.
- BARRÈRE, G.C., BARBER, C.E. E DANIELS, M.J., 1986. Molecular cloning of genes involved in the production of the extracellular polysaccharide xanthan by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Int. J. Biol. Macromol.*, 8: 372-374.
- BENNETT, R.A. e BILLING, E., 1980. Origin of the polysaccharide ooze from plants infected with *Erwinia amylovora*. *J. Gen. Microbiol.*, 116: 341-349.
- BETLACH, M.R., CAPAGE, M.A., DOHERTY, D.H., HASSLER, R.A., HENDERSON, N.M., VANDERSLICE, R.W., MARRELLI, J.D. e WARD, M.B., 1987. Genetically engineered polymers: Manipulation of xanthan biosynthesis. Pag. 35-50 in: *Progress in Biotechnology 3. Industrial Polysaccharides: Genetic Engineering, Structure/Property Relations and Applications*. M. Yalpani, ed. Elsevier, Amsterdam.
- BETLACH, M.R., CAPAGE, M.A., DOHERTY, D.H., HASSLER, R.A. e HENDERSON, N.M., 1988. Molecular biology of xanthan gum biosynthesis in *Xanthomonas campestris*. Pres. 1988 Am. Chem. Soc. Meeting, Sept., 1988.

- BETLACH, M.R., CAMPBELL, D.S., GOLD, M., *et al.*, 1989. Recombinant Dna mediated biosynthesis of xanthan gum in denitrifying pseudomonads under anaerobic conditions. Pres. Annual AIChE Meeting, Nov., 1989.
- BIRNBOIM, H.C. e DOLY, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7: 1513.
- BOCCARA, M.; DIOLEZ, A.; ROUVE, M. e KOTOUJANSKY, A., 1988. The role of individual pectate lyases of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937 in pathogenicity on saintpaulia plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 33: 95-104.
- BOULNOIS, G.J. e JANN, K., 1989. Bacterial polysaccharide capsule synthesis, export and evaluation of structural diversity. *Mol. Microbiol.*, 3: 1819-1823.
- BRADBURY, J.F., 1984. *Xanthomonas* Dowson 1939. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.1. KRIEG, N.R. E HOLT, eds. The Williams e Wilkins Co., Baltimore, Maryland.
- BRADSHAW-ROUSE, J.J., WHATLEY, M.A., COPLIN, D.L., WOODS, A., SEQUEIRA, L. e KELMAN, A., 1981. Agglutination of strains of *Erwinia stewartii* with a corn agglutinin: Correlation with extracellular polysaccharide production and pathogenicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 344-350.
- BRILL, J.A., QUINLAN-WALSHE, C. e GOTTESMAN, S., 1988. Fine structure mapping and identification of two regulators of capsule synthesis in *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.*, 170: 2599-2611.

- BRUMBLEY, S.M. e DENNY, T.P., 1990. Cloning of wild-type *Pseudomonas solanacearum* *phcA*, a gene that when mutated alters expression of multiple traits that contribute to virulence. *J. Bacteriol.*, 172: 5677-5685.
- BUDDENHAGEN, I. e KELMAN, A., 1964. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2: 203-230.
- CADMUS, M.C.; ROGOVIN, S.P.; BURTON, K.A.; PITTSLEY, J.E.; KNUTSON, C.A. e JEANES, A., 1976. Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain. *Canad. J. Microbiol.*, 22: 942.
- CHEN, H., GRAY, J.X., NAYUDU, M., DJORDJEVIC, M.A., BATLEY, M., REDMOND, J.W. e ROLFE, B.G., 1988. Five genetic loci involved in the synthesis of acidic exopolysaccharides are closely linked in the genome of *Rhizobium* sp. strain NGR234. *Mol. Gen. Genet.*, 211: 310-316.
- COOK, D. e SEQUEIRA, L., 1991. Genetic and biochemical characterization of a *Pseudomonas solanacearum* gene cluster required for extracellular polysaccharide production and for virulence. *J. Bacteriol.*, 173: 1654-1662.
- COPLIN, D.L. e COOK, D., 1990. Molecular genetics of extracellular polysaccharide bioynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3: 271-279.

- COPLIN, D.L. e MAJERCZACK, D.R., 1990. Extracellular polysaccharide genes in *Erwinia stewartii*: Directed mutagenesis and complementation analysis. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 3: 286-292.
- COSTERTON, J.W.; CHENG, K.J.; GEESEY, G.G.; LADD, T.I.; NICKEL, J.C. *et al.*, 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.*, 41: 435-464.
- COTTREL, I.W., 1979. Industrial potential of fungal and bacterial polysaccharides. In: SANDFORD e MATSUDA, eds. p. 251-270 (ACS Symposium Series, 126).
- DANIELS, M.J., BARBER, C.E., TURNER, P.C., SAWCZYC, M.K., BYRDE, R.J.W. e FIELDING, A.H., 1984. Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. *Embo J.*, 3: 3323-3328.
- DANIELS, M.J., OSBOURNE, A.E. e TANG, J.L., 1989. Regulation in *Xanthomonas*-plant interactions. In *Signal Molecules in Plants and Plant-Microbe Interactions*. NATO ASI Series, ed. B.J.J. Lugtenberg H36:189-196. Berlin: Springer-Verlag.
- DE FEYTER, R. e GABRIEL D.W., 1991. At least six avirulence genes are clustered on a 90 Kilobase plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 4: 423-432.
- DENNY, T.P., MAKINI, F.W. e BRUMBLEY, S.M., 1988. Characterization of *Pseudomonas solanacearum* Tn5 mutants deficient in extracellular polysaccharide. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1: 215-223.

- DENNY, T.P. e BAEK, S.R., 1991. Genetic evidence that extracellular polysaccharide is a virulence factor of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2: 198-206.
- DERETIC, V., TOMASEK, P., DARZINS, A. e CHAKRABARTY, A.M., 1986. Gene amplification induces mucoid phenotype in *rec-2 Pseudomonas aeruginosa* exposed to kanamycin. *J. Bacteriol.*, 165: 510-516.
- DESTEFANO, S.A.L. e ROSATO, Y.B., 1991. Effect of transposon Tn5 on exopolysaccharide production by *Xanthomonas campestris*. *Rev. Brasil. Genet.*, 14: 599-607.
- DITTA, G., STANFIELD, S., CORBIN, D. e HELINSKI, D., 1980. Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 7347-7351.
- DJORDEVIC, S.P., CHEN, H., BATLEY, M., REDMOND, J.W. e ROLFE, B.G., 1987. Nitrogen fixation ability of exopolysaccharide synthesis mutants of *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *Rhizobium trifolii* is restored by addition of homologous exopolysaccharides. *J. Bacteriol.*, 169: 53-60.
- DOLPH, P.J., MAJERCZAK, D.R. e COPLIN, D.L., 1988. Characterization of a gene cluster for exopolysaccharide biosynthesis and virulence in *Erwinia stewartii*. *J. Bacteriol.*, 170: 865-871.

- DORMAN, C.J., 1991. DNA supercoiling and environmental regulation of gene expression in pathogenic bacteria. *Infect. Immun.*, 59: 745-749.
- DOW, J.M., MILLIGAN, D.E., JAMIESON, L., BARBER, C.E. e DANIELS, M.J., 1989. Molecular cloning of a polygalacturonate lyase gene from *Xanthomonas campestris* pv *campestris* and role of the gene product in pathogenicity. *Mol. Plant Pathol.*, 35: 113-120.
- DUMS, F., DOW, J.M. e DANIELS, M.J., 1991. Structural characterization of protein secretion genes of the bacterial phytopathogen *Xanthomonas campestris* patovar *campestris*: relatedness to secretion systems of other gram-negative bacteria. *Mol Gen. Genet.*, 229: 357-364.
- DYE, D.W. e LELLIOT, R.A., 1974. Genus II. *Xanthomonas* Dowson 1939, 187. In: BUCHANAN, R.E. e GIBBONS, N.E. eds., *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. Willimas e Wilkins Co., Baltimore, Maryland.
- FETT, W.F., OSMAN, S.F. e DUNN, M.F., 1989. Characterization of exopolysaccharides produced by plant-associated fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 579-583.
- FERRIS, G.G. e BEVERDGE, T.J., 1985. Functions of bacterial cell surface structures. *BioScience* 35: 172-177.
- GLAZEBROOK, J. e WALKER, G.C., 1989. A novel exopolysaccharide can function in place of the Calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfafa by *Rhizobium melilot*. *Cell*, 56: 661-672.

- GOSS, T.J.; O'HARA, G.W.; DILWORTH, M.J. e GLENN, A.R., 1990. Cloning, characterization and complementation of lesions causing acid sensitivity in Tn5-induced mutants of *Rhizobium meliloti* WSM419. *J. Bacteriol.*, 172: 5173-5179.
- GOTTESMAN, S., TRISLER, P. e TORRES-CABASSA, A.S., 1985. Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K12: Characterization of three regulatory genes. *J. Bacteriol.*, 162: 1111-1119.
- GOTTESMAN, S. e STOUT, V., 1991. Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K12. *Mol. Microbiol.*, 5: 1599-1606.
- GROSS, M. e RUDOLPH, K., 1987. Studies on the extracellular polysaccharide produced in vitro by *Pseudomonas phaseolicola*. *J. Phytopath.*, 119: 289-297.
- HARDING, N.E., CLEARY, J.M., CABANAS, D.D., ROSEN, I.G. e KANF, D.S., 1987. Genetic and physical analysis of a cluster of genes essential for xanthan gum biosynthesis in *Xanthomonas campestris*. *J. Bacteriol.*, 169: 2854-2861.
- HENIKOFF, S., 1987. Unidirectional digestion with exonuclease III in DNA sequence analysis. *Methods Enzimol.*, 155: 156-165.
- HORTON, D., MOLS, O. e WALASZEK, Z., 1985. Structural and biosynthetic studies on xanthan by ¹³C-n.m.r. spectroscopy. *Carbohydr. Res.*, 141: 340-346.
- HÖTTE, B., RUTH-ARNOLD, I., PUHLER, A. e SIMON, R., 1990. Cloning and analysis of a 35,3Kilobase DNA region involved in exopolysaccharide production in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J. Bacteriol.*, 172: 2804-2807.

- HUANG, J., SUKORDHAMAN, M. e SCHELL, M.A., 1989. Excretion of the *egl* gene product of *Pseudomonas solanacearum* utilizes an unusual signal sequence. *J. Bacteriol.*, 171: 3767-3774.
- IELPI, L., COUSO, R.O. e DANKERT, M.A., 1981a. Lipid linked intermediates in the biosynthesis of xanthan gum. *FEBS Lett.*, 130: 253-256.
- IELPI, L., COUSO, R.O. e DANKERT, M.A., 1981b. Xanthan gum biosynthesis: pyruvic acid acetal residues are transferred from phosphoenolpyruvate to the pentasaccharide-P-lipid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 102: 1400-1408.
- JAN, K. e JANN, B., 1991. Genetic approaches to oligosaccharide metabolism. *Biochem. Soc. Trans London*, 19: 623-628.
- JEANES, A., PITTSLEY, J.E. e SENTI, F.R., 1961. Polysaccharide B-1459: a new hydrocolloid polyelectrolyte produced from glucose by bacterial fermentation. *J. Appl. Polymer Sci.*, 5: 519-526.
- KAMOUN, S., COOLEY, M.B., ROGOWSKY, P.M. e KADO, C.I., 1989. Two chromosomal loci involved in production of exopolysaccharide in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.*, 171: 1755-1759.
- KAO, C.C. e SEQUEIRA, L., 1991. A gene cluster required for coordinated biosynthesis of lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide also affects virulence of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Bacteriol.*, 173: 7841-7847.

- KAO, C.C., BARLOW, E. e SEQUEIRA, L., 1992. Extracellular polysaccharide is required for wild-type virulence of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Bacteriol.*, 174: 1068-1071.
- KOPLIN, R., ARNOLD, W., HOTTE, B., SIMON, R., WANG, G. e PUHLER, A., 1992. Genetics of xanthan production in *Xanthomonas campestris*: the *xanA* and *xanB* genes are involved in UDP-glucose and GDP-mannose biosynthesis. *J. Bacteriol.*, 174: 191-199.
- KRONCKE, K.D., GOLECKI, J. e JANN, K., 1990. Further electron microscopic studies on the expression of *E.coli* group II capsules. *J. Bacteriol.*, 172: 3469-3472.
- LEIGH, J.A., SIGNER, E.R. e WALKER, G.C., 1985. Exopolysaccharide deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 6231-6235.
- LEIGH, J.A. e LEE, C.C., 1988. Characterization of polysaccharides of *Rhizobium meliloti* *exo* mutants that form ineffective nodules. *J. Bacteriol.*, 170: 3327-3332.
- LEIGH, J.A. e COPLIN, D.L., 1992. Exopolysaccharides in Plant-Bacterial interactions. *Annu. Rev. Microbiol.*, 46: 307-346.
- LEONG, S.A., DITTA, G.S. e HELINSKI, D.R., 1982. Heme biosynthesis in *Rhizobium*. Identification of a cloned gene coding for amino-levulinic acid synthetase from *Rhizobium meliloti*. *J. Biol. Chem.*, 257: 8724-8730.
- LEYNS, F., DE CLEENE, M., SWINGS, J.G. e DE LEY, J., 1984. The host range of the genus *Xanthomonas*. *The Botan.Rev.*, 50: 308-356.

- MANIATIS, T., FRITSCH, E. F. e SAMBROOK, J., 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA.
- MARCUS, H. e BAKER, N.R., 1985. Quantitation of adherence of mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* to hamster tracheal epithelium. *Infect. Immun.* 47: 723-729.
- MARQUES, L.R., 1992. Isolamento de genes envolvidos na patogenicidade de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Tese de Mestrado apresentada na Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
- MARZOCCA, P.M., HARDING, N.E., PETRONI, E.A., CLEARY, J.M. e IELPI, L., 1991. Location and cloning of the ketal pyruvate transferase gene of *Xanthomonas campestris*. *J. Bacteriol.*, 173: 7519-7524.
- MELTON, L.D., MINDT, L., REES, D.A. e SANDERSON, G.R., 1976. Covalent structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*: evidence from partial hydrolysis studies. *Carbohydr. Res.*, 46: 245-257.
- MORALES, V.M., STEMMER, W.P.C. e SEQUEIRA, L., 1985. Genetics and avirulence in *Pseudomonas solanacearum*. Pag. 89-96 in: Plant Cell/ Cell Interactions. I. Sussex, A. Ellingboe, M. Crouch and R. Malmberg, eds. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- NORBERG, A.B. e PERSSON, H., 1984. Accumulation of heavy-metal ions by *Zoogloea ramigera*. *Biotechnol. Bioeng.*, 26: 239-246.

- NORKRANS, B., 1980. Surface microlayers in aquatic environments. Pag. 51-86 in: *Advances in Microbial Ecology*. M. Alexander, ed. Plenum Press, New York.
- OHMAN, D.E., 1986. Molecular genetics of exopolysaccharide production by mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, 5: 6-10.
- PAUL, F., MORIN, A. e MONSAN, P., 1986. Microbial polysaccharides with actual potential industrial applications. *Biotech. Adv.*, 4: 245-259.
- PIMENTA, A.L., ROSATO, Y.B. e ASTOLFI FILHO, S., 1991. Expression of a subcloned alpha-amylase gene under the control of a *Xanthomonas campestris* promoter. *Fems Microbiol. Lett.*, 90: 11-18.
- RAMIREZ, M.E., FUCIKOVSKY, L., GARCIA-JIMENEZ, F., QUINTERO, R. e GALINDO, E., 1988. Xanthan gum production by altered pathogenicity variants of *Xanthomonas campestris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29: 5-10.
- RAMPHAL, R. e PIER, G.B., 1985. Role of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide in adherence to tracheal cells. *Infect. Immun.* 47: 1-4.
- ROMEIRO, R., KARR, A. e GOODMAN, R., 1981. Isolation of a factor from apple that agglutinates *Erwinia amylovora*. *Plant Physiol.*, 68: 772-777.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. e MANIATIS, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2ª edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, N.Y., USA.

- SANDFORD, P.A., 1979. Extracellular microbial polysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 36: 256-310.
- SANDVICK, E.I. e MAERKER, J.M., 1977. Application of xanthan gum for enhanced oil recovery. In: SANDFORD, P.A. e LASKIN, A., eds. (*ACS Symposium Series*, 45, p. 242-264).
- SANGER, F., NICKLEN, S. e COULSON, A.R., 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74: 5463-5467.
- SANZEY, B., 1979. Modulation of gene expression by drugs affecting deoxyribonucleic acid gyrase. *J. Bacteriol.*, 138: 40-47.
- SHUMAN, H. e SCHWARTZ, M., 1975. The effect of nalidixic acid on the expression of some genes in *Escherichia coli*. *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, 64: 204-209.
- SIERRA, G., 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leewenhoek Ned. Tij. Dschr. Hyg.*, 23: 15-22.
- SOW, P. e DEMAINE, A.L., 1979. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL-B1459. *Appl. Environm. Microbiol.*, 31: 1186-1192.
- STODDARD, R.W., 1984. The Biosynthesis of Polysaccharides. Macmillan Publishing Co., New York. pp.354.

- STOUT, V. e GOTTESMAN, S., 1990. RcsB and RcsC, a two component regulator of capsule synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 172: 659-669.
- STRIPECKE, R., ROSATO, Y.B. e ASTOLFI FILHO, S., 1989. Subcloning and expression of alpha-amylase from *Bacillus subtilis* in *Xanthomonas campestris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31: 512-517.
- SUTHERLAND, I.W., 1977. Bacterial exopolysaccharides - their nature and production. In *Surface Carbohydrates of the Procariotic Cell*, ed. I.W. Sutherland, pp. 27-96. New York: Academic.
- SUTHERLAND, I.W., 1979. Microbial exopolysaccharides: control of synthesis and acylation. p. 40-57. In: R.C.W. BERKELEY, G.W. GOODAY AND D.C. ELWOOD (eds.), *Microbial polysaccharides and polysaccharases*. Academic Press, Inc. (London), Ltd., London.
- SUTHERLAND, I.W., 1983. Extracellular polysaccharides. *Biotechnology* vol. 3, ed. H. Dellweg. Verlag Chemie - Weinheim. pp.531-574.
- SUTHERLAND, I.W., 1988. Bacterial surface polysaccharides: structure and function. *Int. Rev. Cytol.*, 113: 187-231.
- SUTTON, J.C. e WILLIAMS, P.H., 1970. Relation of xylem plugging to black rot lesion development in cabbage. *Canad. J. Bot.*, 48: 391-401.

- TANG, J.-L., GOUGH, C.L., BARBER, C.E., DOW, J.M. e DANIELS, M.J., 1987. Molecular cloning of protease gene(s) from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: expression in *Escherichia coli* and role in pathogenicity. *Mol. Gen. Genet.*, 210: 443-448.
- TANG, J.-L., GOUGH, C.L. e DANIELS, M.J., 1990. Cloning of genes involved in negative regulation of production of extracellular enzymes and polysaccharide of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Mol. Gen. Genet.*, 222: 157-160.
- TANG, J.-L., LIU, Y.-N., BARBER, C.E., DOW, J.M., WOOTTON, J.C. e DANIELS, M.J., 1991. Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol. Gen. Genet.*, 226: 409-417.
- THORNE, L., TANSEY, L. e POLLOCK, T.J., 1987. Clustering of mutations blocking synthesis of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. *J. Bacteriol.*, 169: 3593-3600.
- TORRES-CABASSA, A., GOTTESMAN, S., FREDERICK, R.D., DOLPH, P.J. e COPLIN, D.L., 1987. Control of extracellular polysaccharide biosynthesis in *Erwinia stewartii* and *Escherichia coli* K12: A common regulatory function. *J. Bacteriol.*, 169: 4525-4531.
- TRISLER, P. e GOTTESMAN, S., 1984. *lon* transcriptional regulation of genes necessary for capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.*, 160: 184-191.

- TROY, F.A., 1979. The chemistry and biosynthesis of selected bacterial capsular polymers. *Annu. Rev. Microbiol.*, 33: 519-560.
- TSENG, Y.H., TING, W.Y., CHON, H.C., YANG, B.Y. e CHEN, C.C., 1992. *Lett. Appl. Microbiol.*, 14: 43-46.
- TURNER,P., BARBER, C. e DANIELS, M.J., 1984. Behavior of the transposons Tn5 and Tn7 in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol. Gen. Genet.*, 195: 101-107.
- VANDERSLICE, R.W., DOHERTY, D.H., CAPAGE, M.A., BETLACH, M.R., HASSLER, R.A., HENDERSON, N.M., RYAN-GRANIERO, J. e TECKLENBURG, M., 1989. Genetic engineering of polysaccharide in *Xanthomonas campestris*. Pag. 145-156 in: *Recent Developments in Industrial Polysaccharides: Biomedical and Biotechnological Advances*. V. Crescenzi, I.C.M. Dea, and S.S. Stivola, eds. Gordon & Breach Science Publishers, New York.
- VIMR, E.R., AARONSON, W. e SILVER, R.P., 1989. Genetic analysis of chromosomal mutations in the polysialic acid gene cluster of *E.coli* K1. *J. Bacteriol.*, 171: 1106-1117.
- VAUTERIN, L., SWINGS, J., KERSTERS, K., GILLIS, K., MEW, T.M., SCHROTH, M.N., PALLERONI, N.J., HILDEBRAND, D.C., STESD, D.E., CIVEROLO, E.L., HAYARD, A.C., MARAITE, H., STALL, R.E., VIDAVER, A.K. e BRADBURY, J.F., 1990. Towards an improved taxonomy of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 312-316.

- VAN den MOOTER, M.; MARAITE, H.; MEIRESONNE, L.; SWINGS, J.; GILLIS, M. KERSTERS, K. e DE LEY, J., 1987. Comparison between *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (ISPP List 1980) and *X. campestris* pv. *cassavae* (ISPP List 1980) by means of phenotypic, protein electrophoretic, DNA hybridization and phytopathological techniques. *J. Gen. Microbiol.*, 133: 57-71.
- XU, P., IWATA, M., LEONG, S. e SEQUEIRA, L., 1990. Highly virulent strains of *Pseudomonas solanacearum* that are defective in extracellular polysaccharide production. *J. Bacteriol.*, 172: 3946-3951.
- WELLS, J., 1977. Extracellular microbial polysaccharides. A critical overview. In SANDFORD, P.A. e LASKIN, A., eds. (*ACS Symposium Series*, 45: 299-325).
- WHITE, T.J. e GONZALES, C.F., 1991. Application of electroporation for efficient transformation of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. *Phytopathol.*, 81: 521-524.
- WHITFIELD, C., SUTHERLAND, I.W. e CRIPPS, R.E., 1981. Surface polysaccharides in mutants of *Xanthomonas campestris*. *J. Gen. Microbiol.*, 124: 385-392.
- WILLIAMS, P.H., 1980. Black rot: a continuing threat to world crucifer. *Plant Dis.*, 64: 736-742.
- YOUNG, J.M., TAKIKAWA, Y., GARDAN, L. e STEAD, D.E., 1992. Changing concepts in the taxonomy of plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 30: 67-105.

APÊNDICE I

 ©Análise estatística Tabela 3 (20 rpm)

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	
	950.0	862.5	12.5	12.5	TRATAMENTO 1: 289Nal ^r
	837.5	900.0	12.5	12.5	TRATAMENTO 2: 289Nal ^r [pUFR027]
	962.5	900.0	12.5	12.5	TRATAMENTO 3: 289Nal ^r [pMV04]
TOTAL	2750.0	2662.5	37.5	37.5	TRATAMENTO 4: 289Nal ^r [pMV08]
MÉDIA	916.667	887.500	12.500	12.500	
S.D.	68.8446	21.6506	0.0000	0.0000	
S.E.	39.7475	12.5000	0.0000	0.0000	

	SQ	GL	QM	F
Tratamentos	2375351.25	3	791783.750	608.14**
Resíduo	10415.75	8	1301.969	
Total	2385767.00	11		

 Desvio padrão residual (s): 36.083 C.V.= 7.9%

TUKEY 5%		DUNCAN 5%	
TRAT 1	916.667 a	TRAT 1	916.667 a
TRAT 2	887.500 a	TRAT 2	887.500 a
TRAT 3	12.500 b	TRAT 3	12.500 b
TRAT 4	12.500 b	TRAT 4	12.500 b
DMS=	94.371	DMS 2	67.914
		DMS 3	70.622
		DMS 4	72.288

APÊNDICE II

©Análise estatística Tabela 4 (20 rpm)

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	
	175.0	562.5	475.0	TRATAMENTO 1: Ca110
	362.5	275.0	725.0	TRATAMENTO 2: Ca110 [pMV04]
	175.0	375.0	625.0	TRATAMENTO 3: Ca110 [pMV08]
TOTAL	712.5	1212.5	1825.0	
MÉDIA	237.500	404.167	608.333	
S.D.	108.2532	145.9523	125.8306	
S.E.	62.5000	84.2656	72.6483	

	SQ	GL	QM	F
Tratamentos	206979.17	2	103489.586	6.36*
Resíduo	97708.33	6	16284.722	
Total	304687.50	8		

Desvio padrão residual (s): 127.612 C.V.= 30.6%

TUKEY 5%		DUNCAN 5%	
TRAT 3	608.333 a	TRAT 3	608.333 a
TRAT 2	404.167 ab	TRAT 2	404.167 ab
TRAT 1	237.500 b	TRAT 1	237.500 b
DMS=	319.756	DMS 2	254.921
		DMS 3	263.762

APÊNDICE II

 ©Análise estatística Tabela 4

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	
	163	300	425	TRATAMENTO 1: Sm ^I
	238	250	450	TRATAMENTO 2: Sm ^I [pMV04]
	275	225	350	TRATAMENTO 3: Sm ^I [pMV08]
TOTAL	675	775	1225	
MÉDIA	225.00	258.33	408.33	
S.D.	57.282	38.188	52.042	
S.E.	33.072	22.048	30.046	

	SQ	GL	QM	F
Tratamentos	57222.23	2	28611.115	11.52**
Resíduo	14895.83	6	2482.639	
Total	72118.06	8		

 Desvio padrão residual (s): 49.826 C.V.= 16.8%

TUKEY 5%		DUNCAN 5%	
TRAT 3	408.33 a	TRAT 3	408.33 b
TRAT 2	258.33 b	TRAT 2	258.33 a
TRAT 1	225.00 b	TRAT 1	225.00 a
DMS=	124.85	DMS 2	99.53
		DMS 3	102.99

APÊNDICE II

 ©Análise estatística Tabela 4

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	
	50.0	2.5	2.5	TRATAMENTO 1: 479Nal ^F
	37.5	2.5	2.5	TRATAMENTO 2: 479Nal ^F [pMV04]
	25.0	2.5	2.5	TRATAMENTO 3: 479Nal ^F [pMV08]
TOTAL	112.5	7.5	7.5	
MÉDIA	37.500	2.500	2.500	
S.D.	12.5000	0.0000	0.0000	
S.E.	7.2169	0.0000	0.0000	

	SQ	GL	QM	F
Tratamentos	2450.00	2	1225.000	23.52**
Resíduo	312.50	6	52.083	
Total	2762.50	8		

Desvio padrão residual (s): 7.217 C.V.= 50.9%

TUKEY 5%		DUNCAN 5%	
TRAT 1	37.500 a	TRAT 1	37.500 b
TRAT 2	2.500 b	TRAT 2	2.500 a
TRAT 3	2.500 b	TRAT 3	2.500 a
DMS=	18.083	DMS 2	14.417
		DMS 3	14.917

APÊNDICE III

 ©Análise estatística Tabela 5 (20rpm)

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	
	350.0	25.0	12.5	TRATAMENTO 1: Ca110Na1 ^r
	550.0	25.0	12.5	TRATAMENTO 2: Ca110Na1 ^r [pMV04]
	450.0	25.0	12.5	TRATAMENTO 3: Ca110Na1 ^r [pMV08]
TOTAL	1350.0	75.0	37.5	
MÉDIA	450.000	25.000	12.500	
S.D.	100.0000	0.0000	0.0000	
S.E.	57.7350	0.0000	0.0000	

	SQ	GL	QM	F
Tratamentos	372187.50	2	186093.750	55.83***
Resíduo	20000.00	6	3333.333	
Total	392187.50	8		

Desvio padrão residual (s): 57.735 C.V.= 35.5%

TUKEY 5%		DUNCAN 5%	
TRAT 1	450.000 a	TRAT 1	450.000 b
TRAT 2	25.000 b	TRAT 2	25.000 a
TRAT 3	12.500 b	TRAT 3	12.500 a
DMS=	144.667	DMS 2	115.333
		DMS 3	119.333

APÊNDICE III

 ©Análise estatística Tabela 5

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	
	50.000	0.001	50.000	TRATAMENTO 1: 420NaI ^r
	37.500	0.001	50.000	TRATAMENTO 2: 420NaI ^r [pMV04]
	25.000	0.001	37.700	TRATAMENTO 3: 420NaI ^r [pMV08]
TOTAL	112.500	0.003	137.700	
MÉDIA	37.5000	0.0010	45.9000	
S.D.	12.50000	0.00000	7.10142	
S.E.	7.21688	0.00000	4.10001	

	SQ	GL	QM	F
Tratamentos	3583.45	2	1791.727	26.01**
Resíduo	413.36	6	68.893	
Total	3996.81	8		

 Desvio padrão residual (s): 8.300 C.V.= 29.9%

TUKEY 5%		DUNCAN 5%	
TRAT 3	45.9000 a	TRAT 3	45.9000 a
TRAT 1	37.5000 a	TRAT 1	37.5000 a
TRAT 2	0.0010 b	TRAT 2	0.0010 b
DMS=	20.7978	DMS 2	16.5808
		DMS 3	17.1558

APÊNDICE III

 ©Análise estatística Tabela 5

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRATAMENTO 1: 411NaI ^r
	0.00100	25.00000	12.50000	
	0.00100	37.50000	12.50000	TRATAMENTO 2: 411NaI ^r [pMV04]
	0.00100	37.50000	12.50000	
				TRATAMENTO 2: 411NaI ^r [pMV08]
TOTAL	0.00300	100.00000	37.50000	
MÉDIA	0.00100	33.33333	12.50000	
S.D.	0.00000	7.21688	0.00000	
S.E.	0.00000	4.16667	0.00000	

	SQ	GL	QM	F
Tratamentos	1701.30	2	850.649	49.00***
Resíduo	104.17	6	17.361	
Total	1805.46	8		

Desvio padrão residual (s): 4.167 C.V.= 27.3%

TUKEY 5%			DUNCAN 5%		
TRAT 2	33.33333	a	TRAT 2	33.33333	a
TRAT 3	12.50000	b	TRAT 3	12.50000	b
TRAT 1	0.00100	c	TRAT 1	0.00100	c
DMS=	10.44042		DMS 2	8.32346	
			DMS 3	8.61214	

APÊNDICE IV

©Análise estatística Tabela 6 (20rpm)

	TRAT 1	TRAT 2	
	700.0	700.0	TRATAMENTO 1: $^{289}\text{NaI}^x$ [pUFR027]
	712.5	620.0	TRATAMENTO 2: $^{289}\text{NaI}^x$ [pMV08]
	725.0	720.0	
TOTAL	2137.5	2040.0	
MEDIA	712.500	680.000	
S.D.	12.5000	52.9150	
S.E.	7.2169	30.5505	

	SQ	GL	QM	F
Tratamentos	1584.17	1	1584.167	1.07 NS
Resíduo	5912.58	4	1478.146	
Total	7496.75	5		

Desvio padrão residual (s): 38.447 C.V.= 5.5%

APÊNDICE V

 ©Análise estatística Tabela 7 (20rpm)

	TRAT 1	TRAT 2	
	925	975	TRATAMENTO 1: 289Sm ^r
	925	1012	TRATAMENTO 2: 289Sm ^r [pMV08]
	975	1075	
TOTAL	2825	3062	
MEDIA	941.67	1020.67	
S.D.	28.868	50.560	
S.E.	16.667	29.191	

	SQ	GL	QM	F
Tratamentos	9361.33	1	9361.333	5.52 NS
Resíduo	6779.67	4	1694.917	
Total	16141.00	5		

Desvio padrão residual (s): 41.169 C.V.= 4.2%

APÊNDICE V

 ☉Análise estatística Tabela 7

	TRAT 1	TRAT 2	
	75	113	TRATAMENTO 1: 411Sm ^r
	100	125	TRATAMENTO 2: 411Sm ^r [pMV08]
	100	113	
TOTAL	275	350	
MEDIA	91.67	116.67	
S.D.	14.434	7.217	
S.E.	8.333	4.167	

	SQ	GL	QM	F
Tratamentos	937.50	1	937.499	7.20 NS
Resíduo	520.83	4	130.208	
Total	1458.33	5		

Desvio padrão residual (s): 11.411 C.V.= 11.0%

APÊNDICE V

 ©Análise estatística Tabela 7

	TRAT 1	TRAT 2	TRATAMENTO 1: 333Sp ^r
	175	200	
	250	175	TRATAMENTO 2: 333Sp ^r [pMV08]
	175	175	
TOTAL	600	550	
MÉDIA	200.00	183.33	
S.D.	43.301	14.434	
S.E.	25.000	8.333	

	SQ	GL	QM	F
Tratamentos	416.66	1	416.661	0.40 NS
Resíduo	4166.67	4	1041.667	
Total	4583.33	5		

Desvio padrão residual (s): 32.275 C.V.= 16.8%
