

BC/24140
IB/80517



UNICAMP

T/UNICAMP

B193_c

CARACTERIZAÇÃO DE UM PLASMÍDIO NATIVO DE *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 333.

Regina Lúcia Baldini

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Regina Lúcia Baldini
aprovada pela Comissão Julgadora. $\frac{31}{01}$
 $\frac{95}{95}$

Y. Bomura

Dissertação apresentada ao
Departamento de Genética e Evolução
do Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas,
para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Yoko Bomura Rosato

Campinas, S.P.

- 1995 -

UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	TUNICAM
	B193c
V.	Ex.
TOMADA	24140
PROC.	433195
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	14/04/95
N.º CPD	

CM-00070096-5

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL - UNICAMP

Baldini, Regina Lucia

B193c Caracterizacao de um plasmidio nativo de *Xanthomonas campestris*
pv. *glycines* 333 / Regina Lucia Baldini. -- Campinas, SP :
[s.n.], 1995.

Orientador : Yoko Bomura Rosato.

Dissertacao (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

1. *Xanthomonas campestris*. 2. Bacterias fitopatogenicas.
3. Bacterias Gram-negativas. 4. Genetica bacteriana. 5. Vetores geneticos. 6. Plasmideos. I. Rosato, Yoko Bomura.
- II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
- III. Titulo.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Yoko Bomura Rosato, pela orientação desde a iniciação científica, pelo ótimo ambiente em seu laboratório e, sobretudo, pela amizade.

À Prof^a Dr^a Laura M. M. Ottoboni, pela leitura crítica deste manuscrito, pela participação na banca e por sua disponibilidade em ajudar sempre que necessitei, no decorrer de trabalho.

Ao Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira, por sua participação na banca e na avaliação do manuscrito, por ceder várias das linhagens de bactérias utilizadas nestes e em outros trabalhos e por facilitar o acesso a seu laboratório, sempre que foi preciso.

À Prof^a Dr^a Christine Hackel, por suas sugestões a respeito do manuscrito, por sua boa vontade como coordenadora da pós-graduação e por sua participação na banca do exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko e à Prof^a Dr^a Anete Pereira de Souza, pela participação na banca do exame de qualificação.

À Prof^a Dr^a Rosa Silva, da Escola Paulista de Medicina, por ceder o banco de sondas de incompatibilidade e ao Prof. Dr. Werner K. Maas, da New York School of Medicine, por permitir a sua utilização.

Aos técnicos Sandra e Wilson, pela grande ajuda prestada durante todo o período em que estive no laboratório.

Às secretárias do CBMEG, Sandra, Tânia e Cláudia, pela eficiência e por nunca estarem mau-humoradas; e às da pós-graduação da Genética, Sílvia e Tereza, pela atenção e disponibilidade.

Aos os professores do CBMEG, por permitirem o acesso a seus laboratórios sempre que necessário.

Aos colegas de laboratório Sandra, Edmilson, Geórgia, Beriam, Henrique e Lizandro, por sugestões, pela convivência e momentos de descontração.

Às colegas do início do trabalho, Rejane, Andréa e Valéria Batista, pela paciência em ajudar uma estagiária e pelo ambiente divertido do laboratório.

Aos amigos Lyriam, Susi, Valéria, e Gonçalo, por inúmeras sugestões, palpites, risadas, apoio moral quando nada dava certo e por uma amizade que vai durar além do mestrado.

A Fabiana e Silvana, pelo apoio e amizade.

A todo o pessoal dos demais laboratórios do CBMEG, em especial ao Chico, Sílvia, Fernando, Andrés, Germano, Maria Elena, Tereza, Edi, Edson, André e Rosângela, pela convivência e pelo auxílio prestado em várias oportunidades.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

A minha mãe, Maria Lydia, e a meus irmãos, Rosa, Renato, Inês e Fernando, por todo o apoio, sempre.

Ao Guilherme, com todo o meu amor.

CARACTERIZAÇÃO DE UM PLASMÍDIO NATIVO DE *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 333.

ÍNDICE

RESUMO	1
INTRODUÇÃO	3
REVISÃO DE LITERATURA	5
1. <i>Xanthomonas campestris</i>	5
2. PLASMÍDIOS NATIVOS DE <i>Xanthomonas campestris</i>	6
3. VETORES DE CLONAGEM PARA <i>Xanthomonas campestris</i>	10
3.1. Vetores derivados do RK2 (IncP)	10
3.2. Vetores derivados do RFS1010 (IncQ)	16
3.3. Vetores derivados do pSa (IncW)	17
3.4. Outros vetores	21
MATERIAL E MÉTODOS	23
1. LINHAGENS E PLASMÍDIOS	23
2. MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTURA	30
3. EXTRAÇÃO DE DNA	31
3.1. DNA plasmidial	31
3.2. DNA cromossômico	31
4. MANIPULAÇÃO DO DNA	32
5. TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDIOS	32
5.1. Transformação por métodos químicos	32
5.2. Eletrotransformação	32
5.3. Conjugação	33
6. HIBRIDIZAÇÃO	33

7. SEQUENCIAMENTO DE DNA.....	34
8. ANÁLISE DO PERFIL PROTEÍCO DE LINHAGENS CONTENDO O p333.1 OU DERIVADOS.....	35
8.1. Extração de proteínas totais de <i>Xanthomonas campestris</i>	35
8.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida denaturante (SDS-PAGE).....	36
8.3. Coloração das proteínas por impregnação por prata.....	36
9. ESTABILIDADE DOS PLASMÍDIOS pXG31 E pXG40 EM <i>X. campestris</i>	37
9.1. Estabilidade durante cultura em meio líquido.....	37
9.2. Estabilidade durante a fermentação.....	38
9.3. Estabilidade durante teste de fitopatogenicidade em sementes de tomate.....	38
10. ESTIMATIVA DO NÚMERO DE CÓPIA DO p333.1.....	39
11. TESTES DE FITOPATOGENICIDADE.....	39
11.1. Teste em plantas adultas.....	40
11.2. Teste em sementes.....	41
12. FERMENTAÇÃO E MEDIDA DE VISCOSIDADE.....	42
13. TESTE DE PRODUÇÃO DE BACTERIOCINA.....	42
RESULTADOS	43
1. PERFIL PLASMIDIAL DA LINHAGEM 333 DE <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>glycines</i> 333.....	43
2. INTRODUÇÃO DE UM MARCADOR DE RESISTÊNCIA A CANAMICINA NO p333.1...43	43
2.1. Construção de subclones <i>Sau3AI</i>	43
2.2. Ligação dos fragmentos <i>Sau3AI</i> ao marcador de resistência a canamicina.....	46
2.3. Construção do pXG31 e derivados.....	46
3. CAPACIDADE CONJUGATIVA DO pXG31.....	50
4. INTRODUÇÃO DOS PLASMÍDIOS pXG31 e pXG40 EM OUTRAS LINHAGENS DE <i>X. campestris</i>	50

5. HOMOLOGIA DO p333.1 COM OUTRAS LINHAGENS DE <i>X. campestris</i>	52
5.1. Homologia com DNA plasmidial.....	52
5.2. Homologia com DNA cromossômico.....	52
6. HIBRIDIZAÇÃO DO p333.1 COM PLASMÍDIOS DE GRUPOS DE INCOMPATIBILIDADE DE <i>E. coli</i>	53
6.1. "Colony - blot" com alguns plasmídios.....	53
6.2. Hibridização com um banco de grupos de incompatibilidade	53
7. ESTIMATIVA DO NÚMERO DE CÓPIA DO p333.1	54
8. ESTABILIDADE DO pXG31 E pXG40 EM <i>Xanthomonas</i>	56
8.1. Estabilidade durante crescimento em meio líquido.....	56
8.2. Estabilidade durante a fermentação	56
8.3. Estabilidade <i>in planta</i> durante teste de sementes	57
9. PERFIL DE PROTEÍNAS TOTAIS DE LINHAGENS PORTADORAS DO p333.1 OU pXG40	61
10. INTERFERÊNCIA DOS PLASMÍDIOS pXG31 E pXG40 NA FITOPATO- GENICIDADE.....	61
10.1. Teste em plantas adultas	61
10.2. Teste em sementes	63
11. INTERFERÊNCIA DOS PLASMÍDIOS pXG31 E pXG40 NA VISCOSIDADE	65
12. TESTE DE CAPACIDADE BACTERIOCINOGÊNICA DAS LINHAGENS PORTADORAS DOS PLASMÍDIOS pXG31 E pXG40	65
13. SEQUENCIAMENTO DO p333.1	66
13.1. Deleção unidirecional e sequenciamento do p1.3	66
13.2. Sequenciamento de outros subclones <i>Sau3AI</i>	66
13.3. Deleção unidirecional e sequenciamento do pX310	67
13.4. Regiões abertas de leitura (ORF's) no p333.1	70
14. CONSTRUÇÃO DE UM PLASMÍDIO BIFUNCIONAL <i>X. campestris</i> - <i>E. coli</i>	72

DISCUSSÃO	75
SUMMARY	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS:

FIGURA 1. ESQUEMA DO VETOR pBluescript II KS+	26
FIGURA 2. ESQUEMA DO PLASMÍDIO pKG1022	27
FIGURA 3. PERFIL DE RESTRIÇÃO DOS CLONES OBTIDOS DA LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DO p333.1 OBTIDOS POR DIGESTÃO COM <i>Sau3AI</i> E LIGADOS AO pBluescript II KS+ / <i>BamHI</i>	45
FIGURA 4. CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDIO pXG31 E DERIVADOS	49
FIGURA 5. PLASMÍDIOS DERIVADOS DO p333.1 EM DIFERENTES LINHAGENS DE <i>X.</i> <i>campestris</i>	51
FIGURA 6. ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO DE DNA DO p333.1 OBTIDA DE 1 ML DE CULTURA DA LINHAGEM 333 PARA A ESTIMATIVA DO NÚMERO DE CÓPIAS.	55
FIGURA 7. ESTABILIDADE DOS DERIVADOS DO p333.1, pXG31 E pXG40, EM MEIO NÃO SELETIVO, NA LINHAGEM 317 DE <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	58
FIGURA 8. ESTABILIDADE DOS PLASMÍDIOS pXG31 E pXG40 NAS LINHAGENS Ca110 E 289, APÓS FERMENTAÇÃO POR 72 HORAS.	59

FIGURA 9. ESTABILIDADE DOS PLASMÍDIOS pXG31 e pXG40 NA LINHAGEM 317, APÓS 14 DIAS DA INOCULAÇÃO EM SEMENTES DE TOMATE.	60
FIGURA 10. TESTE DE FITOPATOGENICIDADE EM FOLHAS DE TOMATEIRO DAS LINHAGENS 317 E 333 QUANDO PORTADORAS DOS DERIVADOS DO p333.1.	62
FIGURA 11. SINTOMAS EM PLÂNTULAS CUJAS SEMENTES FORAM TRATADAS COM LINHAGENS CONTENDO OS DERIVADOS DO p333.1.	64
FIGURA 12. SUBCLONES UTILIZADOS NO SEQUENCIAMENTO DO p333.1.	68
FIGURA 13. SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DO p333.1.	69
FIGURA 14. ETAPAS DA CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDIO BIFUNCIONAL pX403.	74
 TABELAS:	
TABELA 1. GENES ISOLADOS A PARTIR DE BANCOS GENÔMICOS DE <i>X. campestris</i> CONSTRUÍDOS COM O COSMÍDIO pLAFR3 (Stasckawicz <i>et al.</i> , 1987).	51
TABELA 2. LINHAGENS DE <i>Escherichia coli</i>	23
TABELA 3. LINHAGENS DE <i>Xanthomonas campestris</i>	24
TABELA 4. PLASMÍDIOS.	25
TABELA 5. PLASMÍDIOS CONTENDOS AS SONDAS DOS GRUPOS DE INCOMPATIBILIDADE (Couturier <i>et al.</i> , 1988)	28
TABELA 6. PLASMÍDIOS CONTRUÍDOS NESTE TRABALHO.	29
TABELA 7. CONCENTRAÇÕES DOS ANTIBIÓTICOS EM MEIO SÓLIDO	30

TABELA 8. SEQUÊNCIA DE TRATAMENTO DO GEL DE POLIACRILAMIDA PARA A COLORAÇÃO DE PROTEÍNAS COM PRATA	37
TABELA 9. VISCOSIDADE DOS CALDOS DE FERMENTAÇÃO (CPS) DAS LINHAGENS Ca110 OU PORTADORA DOS DERIVADOS DO p333.1	65
TABELA 10. PROVÁVEIS REGIÕES ABERTAS DE LEITURA (ORF's) DO p333.1	71

RESUMO

Xanthomonas campestris é uma bactéria que apresenta grande interesse de estudo, tanto no que diz respeito à fitopatogenicidade quanto à produção de goma xantana. Apesar de vários trabalhos já terem sido realizados, utilizando-se ferramentas da biologia molecular, falta para esta bactéria um vetor de clonagem específico, multicópia e estável. Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi caracterizar um miniplasmídeo da linhagem 333 do patovar (pv.) *glycines*, o p333.1, para avaliar seu potencial para a futura construção de tal vetor de clonagem. Este plasmídeo possui 5 sítios de restrição para *Sau3AI*, um para *PvuII* e vários para *HaeIII*, não sendo digerido por *AccI*, *AvaI*, *BamHI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HincII*, *HindIII*, *PstI*, *KpnI*, *SacI*, *SmaI*, *SphI*, *XbaI* e *XhoI*. Apresentou cerca de 20 cópias por célula e não foi detectada nenhuma proteína codificada por ele.

A partir de uma digestão parcial com *HaeIII*, foi inserido um fragmento contendo um locus de estabilização e um gene de resistência à canamicina, sendo originado o pXG31, que se mantém em *X. campestris*, mas não em *E. coli*. Um derivado deste foi construído, o pXG40, pela deleção do locus de estabilidade. Ambas as construções se mostraram estáveis em cultura sem seleção por 27 horas, em testes de fitopatogenicidade em plântulas de tomate por 15 dias e durante a fermentação por 72 horas. Estes plasmídios não alteraram os fenótipos das linhagens 317 e 333 quanto à patogenicidade em testes com plantas adultas ou sementes de tomate, nem das linhagens 289 e Ca110 frente à produção de goma xantana.

A produção de bacteriocina da linhagem hospedeira natural do p333.1 não está relacionada com sua presença e ele não apresenta capacidade conjugativa.

O pXG31 e pXG40 foram transferidos por eletroporação com sucesso para linhagens dos patovares *campestris*, *manihotis*, *vesicatoria* e *glycines* e foi verificado que os plasmídios nativos dessas linhagens são compatíveis com o p333.1. O p333.1 não

apresentou hibridização com plasmídios das linhagens 289 e 479, com DNAs cromossômicos de *X. campestris* nem com plasmídios de 22 grupos de incompatibilidade de *E. coli*.

Foram realizadas tentativas de se subclonar a região essencial para a replicação do p333.1, sem que se obtivessem resultados positivos. Isto pode indicar que uma região extensa do plasmídio está envolvida com sua própria manutenção, ou que os sítios de *Sau3AI* utilizados nas subclonagens interromperam essa região.

O p333.1 foi subclonado e sequenciado, sendo que não foram encontradas regiões com motivos de origens de replicação, sequências consenso de promotores de *E. coli* ou *X. campestris*, nem com sequências depositadas no GenBank. Ele apresenta 1741 pares de base e 60,3% de C+G.

A fim de que possa vir a ser construído um vetor de clonagem bifuncional *X. campestris* - *E. coli*, foi introduzido no pXG40 um fragmento contendo a origem de replicação do vetor pBluescript II KS+ (ColE1), originando dois plasmídios, o pX402 e o pX403. Este último apresenta sítios únicos para as enzimas de restrição *Bam*HI, *Eco*RI, *Kpn*I e *Sac*I, que podem ser utilizados para clonagens.

Concluindo, tem-se que o p333.1 é um plasmídio críptico estável, multicópia, não-conjugativo e que não interfere na fitopatogenicidade e produção de goma xantana; características que serão desejáveis para um futuro vetor de clonagem. Além disso, ele deve representar um novo grupo de plasmídios de bactérias fitopatogênicas.

INTRODUÇÃO

Xanthomonas campestris é uma bactéria gram-negativa e fitopatogênica, causando inúmeras doenças em diversas plantas. A espécie é dividida em 143 patovares, classificados de acordo com a especificidade ao hospedeiro (Vauterin *et al.*, 1990). Sua importância também se deve à produção de um biopolímero, a goma xantana, de grande aplicação industrial (Jeanes *et al.*, 1961). Tanto a patogenicidade quanto a produção de goma xantana têm sido analisadas por técnicas de biologia molecular. Estas técnicas, provenientes daquelas empregadas em estudos com *Escherichia coli*, são utilizadas com relativo sucesso. Uma das dificuldades encontradas nos trabalhos com *X. campestris* é a falta de vetores de clonagem específicos para *X. campestris*, já que os vetores mais eficientes em *E. coli* se mostram incompatíveis com o genoma de *Xanthomonas*.

Os vetores de clonagem para *X. campestris* são derivados de plasmídios de grupos de incompatibilidade IncP, IncQ e IncW de *E. coli* (Pinkney & Thomas, 1987; DeFeyter *et al.*, 1990). Apenas um vetor citado na literatura possui sequências nativas de *X. campestris*, porém com origem de replicação de *E. coli* (Murooka *et al.*, 1987). Estes vetores são usualmente transferidos de um gênero para outro por conjugação triparental (Pinkney & Thomas, 1987). Recentemente, foram estabelecidos métodos de eletrotransformação de diversos patovares de *Xanthomonas* (White & Gonzales, 1991; Shaw & Kahn, 1993; Ferreira *et al.*, *in press*), tornando-se possível a introdução de plasmídios não-mobilizáveis nesta bactéria.

Os vetores mais utilizados atualmente, da série pUFR (DeFeyter *et al.*, 1990; DeFeyter & Gabriel, 1991b), apesar de estáveis, têm apresentado uma série de inconvenientes de ordem prática. Eles são relativamente grandes (de 8,7 a 10,3 kilobases, kb) e apresentam pequeno número de cópias, o que acarreta um baixo rendimento nas

preparações; são de difícil digestão com enzimas de restrição e há poucos sítios únicos que podem ser utilizados em clonagens.

Em vista destes problemas, com o objetivo final de se construir um vetor de clonagem estável e específico para *Xanthomonas campestris*, este trabalho consistiu da caracterização de um miniplasmídeo nativo da linhagem 333 (pv. *glycines*), denominado p333.1. Além da possibilidade de se construir um vetor de clonagem, a caracterização do miniplasmídeo permitiu verificar as relações de homologia com outros grupos de compatibilidade já conhecidos.

REVISÃO DE LITERATURA

1. *Xanthomonas campestris*.

O gênero *Xanthomonas* apresenta distribuição mundial e consiste de bactérias gram-negativas em forma de bastonetes, estritamente aeróbicas, que apresentam coloração amarela devido ao pigmento xantomonadina, possuem um flagelo polar e são geralmente fitopatogênicas (Agrios, 1989). Segundo Van den Mooter (1987), são oito espécies: *X. albilineans*, *X. axonopodis*, *X. campestris*, *X. fragariae*, "*X. graminis*", *X. maltophilia*, "*X. orizae*" e "*X. populi*". Porém, esta divisão é discutível, sendo que Young *et al.* (1992) argumentam que *X. maltophilia*, não-patogênica para plantas e anteriormente classificada como *Pseudomonas*, deveria estar num gênero separado. Outros autores, como Gabriel *et al.* (1989), consideram algumas linhagens dos patovares citri e phaseoli como espécies em separado, *X. citri* e *X. phaseoli*. Esta divisão não é levada em conta por outros taxonomistas, que argumentam que a separação foi feita apenas com dados obtidos de RFLP (*restriction fragment length polymorphisms*) (Vauterin *et al.*, 1990; Civerolo & Stall, 1991).

X. campestris, a espécie mais estudada, é subdividida em patovares, de acordo com a planta hospedeira. Como exemplo, *X. campestris* pv. *campestris* infecta crucíferas; *X. campestris* pv. *vesicatoria*, tomate e pimentão; *X. campestris* pv. *glycines*, soja; *X. campestris* pv. *manihotis*, mandioca. O termo patovar é uma convenção para facilitar o estudo dos fitopatologistas, não sendo considerado um táxon pelos estudiosos de sistemática, pois reflete apenas uma característica fenotípica (Vauterin *et al.*, 1990). São reconhecidos 143 patovares, com espectro de hospedeiros que incluem 66 gêneros de monocotiledôneas e 160 de dicotiledôneas (Young *et al.*, 1991). Exemplos de doenças causadas por *X. campestris* são o cancro cítrico (Civerolo, 1985), podridão negra em

crucíferas (Gabriel *et al.*, 1984), mancha bacteriana em tomate e pimentão (Rodrigues-Neto *et al.*, 1984) e "bacterial blight" em algodão (Gabriel *et al.*, 1986).

Além da importância como fitopatógeno, *X. campestris* é produtora de um polissacarídeo denominado goma xantana, de ampla aplicação industrial (Jeanes *et al.*, 1961). Devido às características da goma xantana, tais como estabilidade a alterações de pH, temperatura e altas concentrações de sais, pode ser utilizada tanto na área alimentícia (em conservas, molhos, laticínios, produtos de panificação, sorvetes, sucos e congelados) ou na formulação de pesticidas, abrasivos, polidores, produtos farmacêuticos e corantes. Além desses usos, existe o potencial de utilização de goma xantana na prospecção de poços de petróleo e recuperação melhorada de óleo (Baird *et al.*, 1983). Biologicamente, a goma xantana teria as potenciais funções de evitar o dessecamento das bactérias, de concentrar nutrientes, de auxiliar na adesão das células a superfícies inertes ou biológicas, poderia agir como uma barreira às defesas do hospedeiro e ainda ter papel no desenvolvimento dos sintomas de doença na planta (Coplin & Cook, 1990).

Portanto, têm-se realizado diversos estudos com esta bactéria, tanto nos aspectos que dizem respeito à fitopatogenicidade quanto à produção de goma xantana, os quais cada vez mais se utilizam de técnicas de biologia molecular.

2. Plasmídios nativos de *Xanthomonas campestris*.

Plasmídios são moléculas de DNA em sua maioria circulares, que se replicam independentemente do cromossomo e que estão presentes em praticamente todas as espécies de procariotos (Day, 1987). Eles geralmente não são essenciais para a célula hospedeira, mas podem auxiliar na sua rápida adaptação a mudanças nas condições ambientais: codificam, por exemplo, resistência a antibióticos, metais e outras toxinas; capacidade de degradar diferentes substratos e produção de toxinas; conferem

amplificação gênica e podem ser transferidos intra ou interespecificamente (Day, 1987; Kües & Stall, 1989). Apesar disso, a maioria é considerada críptica, ou seja, não se atribuiu nenhuma função a eles. Seu tamanho pode variar consideravelmente, sendo que o pZA2 de *Zymomonas anaerobia* apresenta 1,7 kb, enquanto que existem megaplasmídios de cerca de 700 kb em bactérias quimiolitotróficas (Kües & Stall, 1989).

A classificação de plasmídios é feita atualmente com base em critérios de incompatibilidade, que é a incapacidade de plasmídios relacionados se propagarem de maneira estável na mesma linhagem celular. Isto acontece quando os plasmídios possuem elementos envolvidos na replicação ou na partição em comum (Couturier *et al.*, 1988).

Há vários relatos na literatura de plasmídios nativos de *Xanthomonas*. Apesar da maioria ser considerada críptica (Civerolo, 1985; Murooka *et al.*, 1987; Stripecke & Rosato, 1988; Tu *et al.*, 1989), já se confirmou a determinação plasmidial de características tais como resistência a cobre (Stall *et al.*, 1986; Dittapongpitch & Ritchie, 1993; Ramos, 1994) e à estreptomicina (Minsavage *et al.*, 1990a), genes de avirulência (Kearney *et al.*, 1988; Stall *et al.*, 1986; DeFeyter & Gabriel, 1991a, Swanson *et al.*, 1988) e a presença de elementos de inserção (Tu *et al.*, 1989; Kearney *et al.*, 1988). O trabalho de Oliveira (1993) sugere que o(s) gene(s) responsáveis pela produção de bacteriocina pela linhagem 333 de *X. campestris* pv. *glycines* também seja(m) plasmidial(is). Dados ainda não publicados do laboratório de Genética de Microrganismos do CBMEG/UNICAMP (Edmilson R. Gonçalves, *comunicação pessoal*) parecem demonstrar a presença de genes envolvidos na patogenicidade do pv. *vesicatoria* num plasmídio de alto peso molecular da linhagem 479.

Quanto à replicação de plasmídios de *X. campestris*, apenas um trabalho é encontrado na literatura (Chang *et al.*, 1991), demonstrando que dois fragmentos não-contínuos provenientes do pXW45N, totalizando cerca de 14 kb, são essenciais para sua replicação em *E. coli*. Em um trabalho anterior, foi relatada a presença de elementos de

inserção oriundos deste mesmo plasmídio, de 64 kb, e de um segundo plasmídio, pXW45J (35 kb), existente na mesma linhagem XW45 de *X. campestris* pv. citri (Tu *et al.*, 1989).

Plasmídios crípticos foram encontrados em *X. campestris* pv. citri por Civerolo (1985) e Murooka *et al.* (1987), com tamanho variando de 12 a 53 MDa (megaDaltons); em *X. campestris* pv. pruni e pv. vitians, com 26 e 43 MDa, respectivamente (Kado & Liu, 1981); em *X. campestris* pv. manihotis, plasmídios de 18, 40 e 72 MDa coexistem numa mesma linhagem (Lin *et al.*, 1979) e nos pv. manihotis, campestris e citri, com tamanhos variando de 14,7 a 65,6 MDa (Stripecke & Rosato, 1988).

Quatro miniplasmídios (1,7; 1,8; 2,28 e 2,5 kb) foram encontrados em linhagens patogênicas para tomate e de *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria raça 2, porém nenhum em 46 linhagens da raça 1, patogênica para pimentão. Nenhuma linhagem continha mais de um miniplasmídio. Os dois plasmídios maiores apresentaram hibridização cruzada, bem como os dois menores, porém os dois grupos não hibridizaram entre si. Para determinar se a resistência a cobre ou estreptomicina de algumas das linhagens estava relacionada com os miniplasmídios, foram realizadas conjugações, onde se observou que os miniplasmídios de 2,28 e 2,5 kb são mobilizáveis, enquanto o plasmídio de 1,7 kb só foi transferido em baixa frequência, e sempre acompanhado de um plasmídio de alto peso molecular. A resistência à estreptomicina não pôde ser associada com os miniplasmídios. Apesar do fenótipo de resistência a cobre ser transferido juntamente com o miniplasmídio de 2,5 kb, e de todas as linhagens resistentes a cobre possuírem miniplasmídios, ele não foi considerado essencial para a determinação desta característica, já que nem todas as receptoras se tornaram resistentes a este metal (Dittapongpitch & Ritchie, 1993).

Além de plasmídios crípticos e de miniplasmídios, também foram detectados e analisados plasmídios de alto peso molecular; sendo que alguns deles estão associados com determinantes de resistência a cobre e genes de avirulência.

Genes de resistência a cobre estão presentes nos plasmídios conjugativos pXV10, pXvCu e pRCV48 de alto peso molecular de *X. campestris* pv. vesicatoria, sendo que os dois primeiros apresentam homologia entre si, o que não foi determinado para o pRCV48 (Bender *et al.*, 1990; Stall *et al.*, 1986; Ramos, 1994). O plasmídio pXvCu (200 kb) também apresenta um locus de avirulência para pimentão, *avrBs1* (Stall *et al.*, 1986; Swanson *et al.*, 1988). Mutantes espontâneos de mudança de raça, ou seja, linhagens avirulentas para pimentão que se tornaram virulentas, foram analisados. Um elemento de inserção, denominado IS476, foi encontrado no gene *avrBs1* destes mutantes, inativando-o e fazendo com que as bactérias passassem a apresentar reação compatível com pimentão. Mais três cópias do IS476 estão presentes no pXvCu, em posições indeterminadas, e em outras linhagens resistentes a cobre (Kearney *et al.*, 1988).

Seis genes de avirulência também estão presentes no plasmídio pXcmH de 90 kb de *Xanthomonas campestris* pv. malvacearum. Plasmídios de *Xanthomonas campestris* pv. malvacearum aparentemente são essenciais para a célula, pois, de 32 linhagens, todas contêm um ou dois plasmídios que hibridizam entre si, indicando uma conservação de sequências neste patovar. Em adição, tentativas de se eliminar o pXcmH da célula falharam. Foi descrita apenas uma linhagem patogênica de *Xanthomonas campestris* pv. manihotis que não contém plasmídios (DeFeyter & Gabriel, 1991a).

A resistência à estreptomicina de várias linhagens do pv. vesicatoria também é codificada por um plasmídio. Minsavage *et al.* (1990a) isolaram, de um banco genômico da linhagem BV5-4a, um fragmento que conferiu esta característica a receptoras anteriormente sensíveis. Após subclonagem e hibridização, foi determinada sua localização num plasmídio de 68 kb. A sonda utilizada apresentou hibridização com DNA total de outras 3 dentre 17 linhagens resistentes, sendo em uma delas a hibridização também em um plasmídio e, em outra, no cromossomo, sugerindo uma integração do plasmídio. Em adição, o gene isolado tem homologia com um gene de resistência à estreptomicina de

Pseudomonas syringae pv. *papulans*, localizado em um plasmídio auto-transmissível. Porém, o plasmídio de 68 kb da linhagem BV5-4a não é conjugativo.

Murooka *et al.* (1987) isolaram um fragmento de um plasmídio críptico de *X. citri* que possibilitou a introdução do pBR325 em linhagens de *Xanthomonas* por conjugação. Portanto, essa região clonada provavelmente contém os fatores necessários para a transferência. Esse trabalho, porém, apresenta controvérsias (ver item 3.4).

3. Vetores de clonagem para *Xanthomonas campestris*.

Os vetores de clonagem empregados em estudos da bactéria *Xanthomonas campestris* são plasmídios ou cosmídios derivados de plasmídios dos grupos de incompatibilidade IncP, IncQ ou IncW (Pinkney & Thomas, 1987; DeFeyer *et al.*, 1990). É interessante que o vetor se mantenha tanto em *E. coli* quanto em *Xanthomonas*, para que possam ser utilizadas as técnicas de biologia molecular desenvolvidas para *E. coli* e para que os clones obtidos possam ser analisados no "background" genético de *Xanthomonas*. Em adição, é desejável que o vetor tenha marcas de seleção que se expressem em *X. campestris* e boa estabilidade, tanto *in vitro* quanto *in planta*.

3.1. Vetores derivados do RK2 (IncP).

Os primeiros vetores a serem utilizados em *X. campestris* foram derivados do RK2 (IncP, 56 kb), um plasmídio de largo espectro de hospedeiro, que confere resistência à ampicilina, tetraciclina e canamicina. Este plasmídio apresenta de 5 a 8 cópias por cromossomo em *Escherichia coli* e é capaz de se transferir por conjugação para várias espécies de bactérias Gram-negativas (Ditta *et al.*, 1980). A transferência por conjugação do RK2 e do RP4 (IncP) para *X. campestris* foi relatada pela primeira vez por Lai *et al.* (1977).

Ditta *et al.* (1980) construíram um vetor de clonagem a partir do RK2, através de deleções, separando as funções de transferência e mobilização. O plasmídeo resultante, o pRK290, apresenta 20 kb, sítios únicos de restrição para as enzimas *EcoRI* e *BglII*, resistência à tetraciclina e é mobilizável, ou seja, contém o sítio *rlx* e pode se transferir por conjugação, se os fatores de transferência forem fornecidos *in trans*, pelo pRK2013 (Figurski & Helinsky, 1979). Um banco genômico da linhagem 102F34 de *Rhizobium meliloti* foi construído (Ditta *et al.*, 1980) com o DNA total desta bactéria fragmentado e clonado no sítio *BglII* do pRK290, com insertos entre 15 e 20 kb (tamanho médio 19 kb). O pRK290 apresenta alguns inconvenientes, tais como apenas dois sítios únicos disponíveis para clonagem e nenhum marcador de inativação insercional, além de um tamanho ainda relativamente grande, dificultando sua manipulação e eficiência de transformação.

Um derivado do pRK290 foi utilizado em trabalhos com *X. campestris*. O pRK293 (Tc^r, Km^r, Mob⁺, Tra⁻; Ditta *et al.*, 1985) foi o vetor utilizado para a construção de um banco genômico da linhagem 0100 de *X. campestris* pv. *campestris*, do qual foi isolado um "cluster" denominado *xps*, que contém genes essenciais para a biossíntese da goma xantana (Harding *et al.*, 1987).

Com o objetivo de aumentar a eficiência de transferência do pRK290, um sítio *cos* foi ligado ao seu sítio *BglII*, originando o pLAFR1 (Friedman *et al.*, 1982). Este cosmídeo, de 21,6 kb e um sítio de clonagem *EcoRI*, pode ser empacotado *in vitro* quando ligado a insertos de 15 -31 kb, proporcionando uma seleção do tamanho dos fragmentos de DNA clonados. Deste modo, um banco construído com este vetor teria todos os clones com tamanhos de insertos semelhantes, numa média de 23 kb, sendo teoricamente necessários apenas 820 clones para se obter 99% de representatividade de um genoma do tamanho do de *E. coli* (~4 100 kb). A partir de um banco genômico de *Rhizobium meliloti* com insertos entre 12,8 e 30,0 kb, foram complementados 6 mutantes auxotróficos desta

bactéria (Friedman *et al.*, 1982). O banco foi transduzido para *E. coli* e depois conjugado *en masse* com os mutantes de *R. meliloti*, com o "helper" pRK2013.

O cosmídio pLAFR1 (IncP) foi transferido de *E. coli* para *X. campestris* pv. *campestris* com o "helper" pRK2073 numa frequência de 3×10^{-4} /receptora e o pKT230 (IncQ), com frequência de 3×10^{-3} por Turner *et al.* (1984). Estes autores relataram que plasmídios dos grupos de incompatibilidade IncP (R68.45) e IncQ (pKT230) podem ser transferidos por conjugação e mantidos em *X. campestris*, mas plasmídios de pequeno espectro de hospedeiro, tais como ColE1, pACYC184 e pBR322 não se replicam nesta bactéria, apesar de poderem ser transferidos. Porém, foi relatada a manutenção do pBR328 em "*X. citri*" (Murooka *et al.*, 1987). Tentativas em nosso laboratório de transferir plasmídios com replicon ColE1 não obtiveram sucesso.

Daniels *et al.* (1984) isolaram genes envolvidos com a patogenicidade de *X. campestris* pv. *campestris* a partir de um banco genômico construído no pLAFR1, sendo esta a primeira descrição da clonagem de genes de *Xanthomonas*. O banco (cerca de 3000 colônias) foi mobilizado da linhagem ED8767 de *E. coli* para mutantes de *X. campestris* pv. *campestris* com o "helper" pRK2013. Foram complementados 4 mutantes auxotróficos, um não-pigmentado e 4 não-patogênicos. Um dos clones, que complementou o mutante não-patogênico 8288 foi denominado pIJ3000. Um mutante não-patogênico e deficiente na produção de protease poligalacturonato liase, o 8237, foi complementado com outro clone, o pIJ3020, que reestabeleceu as três características selvagens. O clone pIJ3000 foi analisado (Turner *et al.*, 1985) através de subclonagens e mutações com o Tn5, sendo que uma região de 10 kb contém pelo menos dois "clusters" de genes envolvidos com a patogenicidade de *X. campestris* pv. *campestris*. Um dos "clusters" controla a secreção de poligalacturonato liase e de outras enzimas extracelulares (Dow *et al.*, 1989).

A partir do banco genômico construído por Daniels *et al.* (1984) no pLAFR1, também foram isolados genes envolvidos na produção de goma xantana (Barrère *et al.*, 1986); um locus envolvido concomitantemente na patogenicidade, produção do exopolissacarídeo e de protease (Rosato *et al.*, 1994), um gene de poligalacturonato liase (Dow *et al.*, 1987) e fatores reguladores de patogenicidade (Tang *et al.*, 1991).

O cosmídio pLAFR1 também foi utilizado na construção de bancos genômicos da linhagem de *X. campestris* pv. *campestris* XC1701 (Liu *et al.*, 1992) e da linhagem PXO61 do patovar *oryzae* (Todd *et al.*, 1990). A partir destes bancos, foram isolados genes requeridos para a secreção de enzimas extracelulares *X. campestris* pv *campestris* e genes envolvidos com a patogenicidade de *X. campestris* pv. *oryzae*.

O pLAFR1 apresenta algumas limitações, tais como baixa eficiência de conjugação comparada com a do pSa747 (Gabriel *et al.*, 1986) e a existência de apenas um sítio de clonagem, *EcoRI*. Em vista disso, Staskawicz *et al.* (1987) inseriram o "polylinker" do pUC8 neste cosmídio, originando o pLAFR3. Outra desvantagem do pLAFR1 é a possibilidade de integração do clone recombinante no cromossomo de *X. campestris*, como relatado por Rosato *et al.* (1994).

Além de contar com um maior número de sítios de restrição, o "polylinker" do pLAFR3 está no interior da região requerida para a α -complementação do gene de β -galactosidase, o que permite a seleção direta dos clones recombinantes em placas contendo IPTG e X-gal (Staskawicz *et al.*, 1987)

O cosmídio pLAFR3 foi utilizado na construção de diversos bancos genômicos de *X. campestris*, sendo que alguns exemplos estão apresentados na Tabela 1. Este vetor também foi inserido por transformação na linhagem 8004 do pv *campestris* (Atkins *et al.*, 1987), com eficiência não determinada.

Vetores derivados do pLAFR1 foram construídos, pela inserção um fragmento *PvuII* de 445 bp contendo o "polylinker" do Bluescript M13 flanqueado pelos promotores

T3 e T7 no seu sítio *EcoRI*. Os cosmídios resultantes, com o "polylinker" em orientações opostas, foram denominados pIJ3200 e pIJ3001 (Liu *et al.*, 1990).

As estabilidades do pIJ3200, pIJ3201 e pIJ3073A (pIJ3200 + fragmento de 10 kb contendo o gene de protease clonado por Tang *et al.*, 1987) em *X. campestris* pv. *campestris* 8004 foram comparadas com as do pLAFR1 e pLAFR3 após 21 horas de cultura em meio líquido sem seleção, plaqueamento em meio também sem seleção e transferência de 100 a 200 colônias para meio com tetraciclina. As taxas de perda obtidas foram de 0,3; 4,6; 0,12; 4,1 e 0,06% por geração, para o pIJ3200, pIJ3201, pIJ3073A, pLAFR1 e pLAFR3, respectivamente. No crescimento em plântulas de nabo, porém, o pLAFR3 e o pIJ3201 se mostraram menos estáveis que o pIJ3200 e o pIJ3073A. Análise da expressão do gene de protease sem promotor clonados em ambas as orientações no pIJ3200 mostraram que os promotores T3 e T7 são funcionais em *X. campestris* pv. *campestris*, mas não em *E. coli* JM107 (Liu *et al.*, 1987).

Posteriormente, foram isolados o gene de avirulência *avrXca* (Parker *et al.*, 1993) e o gene de protease *prtC* (Dow *et al.*, 1993) de *X. campestris* pv. *raphani* 1067 a partir de um banco genômico construído no pIJ3200.

TABELA 1. Genes isolados a partir de bancos genômicos de *X. campestris* construídos com o cosmídio pLAFR3 (Stasckawicz *et al.*, 1987).

Patovar / Linhagem	Genes isolados	Referência
Xcv raça 2 81-23rif ^r	<i>avrBs1</i>	Swanson <i>et al.</i> , 1988.
XcvT raça 2 75-3	<i>avrRxv</i>	Whalen, <i>et al.</i> , 1988. Whalen, <i>et al.</i> , 1993.
Xcc 8004	protease endoglucanase genes de regulação negativa da produção de enzimas extracelulares e exopolissacarídeo	Tang <i>et al.</i> , 1987. Gough, <i>et al.</i> , 1988. Tang <i>et al.</i> , 1990
Xcvi NCPPB 1840	<i>avr</i> <i>hrp</i>	Roberts <i>et al.</i> , 1987. Arlat <i>et al.</i> , 1991.
Xcv BV5-4a	gene de resistência à estreptomicina	Minsavage <i>et al.</i> , 1990a.
XcvT raça 1 75-3	<i>avrBsT</i> e <i>avrBs2</i> <i>hrpA-hrpF</i> associado ao lipopolissacarídeo	Minsavage <i>et al.</i> , 1990b. Bonas <i>et al.</i> , 1991. Schulte & Bonas, 1992. Jones <i>et al.</i> , 1993
XcvP raça 1 71-21 (banco plasmidial)	<i>avrBs3</i>	Minsavage <i>et al.</i> , 1990b. Bonas <i>et al.</i> , 1989.
Xcv 2595S	<i>dsp</i>	Seal <i>et al.</i> , 1990.
Xcv XV56	<i>pelXVI</i> (pectato liase)	Beaulieu <i>et al.</i> , 1991.
Xcv XV 87-7	<i>avrBsP</i>	Canteros <i>et al.</i> , 1991.
Xcg 8ra	patogenicidade	Hwang <i>et al.</i> , 1992.
XccB24	sondas para identificação de patovares	Poplawsky, 1993.

Abreviações: Xcv, *X. campestris* pv. vesicatoria; Xcc, *X. campestris* pv. campestris; Xcvi, *X. campestris* pv. vitians; Xcg, *X. campestris* pv. glycines; *avr*, gene de avirulência; *dsp*, gene específico de doença; *hrp*, gene de hipersensibilidade.

3.2. Vetores derivados do RSF1010 (IncQ).

Plasmídios do grupo IncQ são multicópia, relativamente pequenos e podem ser mobilizáveis por outros plasmídios conjugativos. O RSF1010 (8,9 kb, Sm^r, Su^r), pertencente a este grupo, foi utilizado para se construir o pMFY40 (Fukuda & Yano, 1985). Este plasmídio consiste de um fragmento do RSF1010 contendo sua origem de replicação e de genes de resistência a tetraciclina e ampicilina isolados do plasmídio pBR313. Ele apresenta 8,6 kb, sítios únicos que possibilitam inativação insercional no gene de resistência à ampicilina (*Pst*I) e tetraciclina (*Bam*HI e *Sal*II), em adição a sítios *Eco*RI e *Pvu*II. O pMFY40 foi transferido para *Pseudomonas putida* tanto por transformação como por conjugação, na presença de um "helper".

Em *X. campestris*, o pMFY40 foi utilizado para se analisar a expressão de um gene de α -amilase de *Bacillus subtilis* em linhagens dos patovares campestris e manihotis (Stripecke *et al.*, 1989), na subclonagem deste mesmo gene e sua expressão sob o comando de um promotor de *X. campestris* (Pimenta *et al.*, 1991) e na clonagem de um gene de resistência a cobre da linhagem 484 do pv. vesicatoria (Ramos, 1994). Um problema encontrado neste último trabalho foi a integração do plasmídio recombinante no cromossomo de *X. campestris*. O pMFY40 apresenta poucos sítios únicos de clonagem e o gene de resistência à ampicilina não tem utilidade em estudos com *X. campestris*, já que praticamente todas as linhagens são naturalmente resistentes a este antibiótico (dados não publicados). Portanto, seu uso é limitado.

Outro plasmídio do grupo IncQ funcional em *X. campestris* é o pKT230 (Km^r, Sm^r, 11,9 kb; Bagdasarian *et al.*, 1981), que pode ser transferido para esta bactéria tanto por conjugação triparental quanto por transformação (Atkins *et al.*, 1987). Estes autores conseguiram transformar a linhagem 8004, com eficiência de 10^2 - 10^3 transformantes/ μ g de DNA, apenas com o DNA do pKT230 isolado de uma linhagem de *X. campestris* proveniente de conjugação, mas não de *E. coli*. Foi proposto que o sistema de restrição da

8004 não permitia a entrada de DNA não modificado, sendo isolado uma linhagem mutante deficiente no sistema de restrição, denominada 8004R (posteriormente, 8460).

Foi também construído um vetor caça-promotor, o pIJ3100 (replicon IncQ, Sm^r, Cm^r), que foi utilizado na clonagem de fragmentos de DNA de *X. campestris* pv. *campestris* com atividade de promotor aumentada *in planta* (Ousbourn *et al.*, 1987). A sequência do gene próximo do promotor isolado foi analisada e verificou-se que ele era requerido para a patogenicidade desta bactéria em plântulas ou plantas adultas de nabo e rabanete. Porém, o gene analisado se mostrou independente do promotor inicialmente estudado, ao qual não foi atribuída nenhuma função na patogenicidade (Ousbourn *et al.*, 1990).

3.3. Vetores derivados do pSa (IncW).

Seguindo aproximadamente a estratégia de construção da dupla vetor de clonagem/ "helper" pRK290/pRK2013 (Ditta *et al.*, 1980; Figurski & Helinsky, 1979), Tait *et al.* (1983) separaram as funções de replicação e partição do plasmídeo pSa. Foram assim originados o pSa747 (replicon IncW, *cos*, Km^r, Sp^r), o pSa322 (replicon ColE1, "helper", Ap^r) e pSa325 (semelhante ao pSa322, porém também Cm^r).

O vetor pSa747 foi utilizado para construir um banco genômico de *X. campestris* pv. *malvacearum* H (XcmH), e transduzido para *E. coli* HB101 com frequência de $3,4 \times 10^5$ colônias/ μ g DNA. Mais de 900 clones foram individualmente transferidos para a linhagem XcmN por conjugação com o "helper" pSa322 (Gabriel *et al.*, 1986). Foram isolados 10 genes de avirulência diferentes, sendo três deles num mesmo clone. A estabilidade do pSa747 em Xcm após 2 semanas da inoculação em plantas de algodão foi de 85%, aumentando para 90% quando um inserto de DNA de Xcm estava presente. Algumas dificuldades no trabalho com o pSa747 relatadas por estes autores foram a sua

não-visualização em gel de agarose e a integração de clones recombinantes no cromossomo ou plasmídios nativos da linhagem receptora.

O mesmo vetor foi utilizado no isolamento de um gene de avirulência do pv. *oryzae* (raça 2, linhagem PX086), através de clones de *X. campestris* pv. *oryzae* obtidos por conjugação com um banco genômico construído em *E. coli* (Kelenu & Leach, 1990). Neste trabalho, não houve integração do clone no cromossomo.

Shaw & Kado (1986) desenvolveram um plasmídio derivado do pUCD4 (Close *et al.*, 1984), o pUCD607, contendo um cassete *lux* de *Vibrio fischeri*, a fim de se verificar o crescimento de bactérias fitopatogênicas nos tecidos da planta antes mesmo do início dos sintomas. O operon *lux* permite um monitoramento visual da infecção, sem que haja distúrbios no sistema, apenas com a autoradiografia das folhas infectadas. O pUCD607 apresenta 20,7 kb, genes de resistência a espectinomicina, canamicina e ampicilina, pode ser mobilizado para bactérias Gram-negativas e é amplificável em *E. coli*. A existência de sítios de clonagem que possibilitam a inativação dos genes de resistência ou do operon *lux* fazem deste plasmídio um potencial vetor de clonagem. Um experimento onde a linhagem 2D520 de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* contendo o pUCD607 foi inoculada em couve-flor demonstrou que os sintomas apareceram onde já havia sido detectada a emissão de luz.

Para estudar a expressão de genes de bactérias fitopatogênicas *in planta*, Rogowsky *et al.* (1987) construíram o plasmídio caça-promotor pUCD615, derivado do pUCD4 (Close *et al.*, 1984), que contém o operon *lux* de *Vibrio fischeri* sem promotor. Este plasmídio, de 17,55 kb, apresenta origens de replicação ColE1 e do pSa, genes de resistência à canamicina e ampicilina e o sítio *bom* (*basis of mobilisation*), que permite que ele seja transferido por conjugação na presença de um "helper". Inicialmente concebido para ser utilizado em trabalhos com *Agrobacterium tumefaciens*, o pUCD615 foi utilizado na construção de bancos genômicos de *X. campestris* pv. *campestris* linhagens

2D520 e seu mutante não-patogênico JS111, obtido por transposição com o Tn4431 (Shaw *et al.*, 1988). Um clone com a marca de resistência do transposon (Tc^r) utilizado na mutagênese foi obtido do banco da JS111 e utilizado como sonda para o "screening" do banco da linhagem selvagem. Deste modo, foram isolados três clones que restauravam a patogenicidade, porém com virulência reduzida. Os autores argumentam que essa menor virulência pode ser devido à baixa taxa de replicação do pUCD615 em *X. campestris*, o que ocasiona perdas da cultura *in planta*, entre outras causas (fragmento clonado incompleto ou pouco funcional *in trans*). Outros problemas apontados são a não-visualização do vetor em gel de agarose e a baixa taxa de transformação de *E. coli*. Foi estabelecido, posteriormente, que o mutante JS111 era um mutante de hipersensibilidade, sendo o gene que o complementa denominado *hrpXc* (Kamoun & Kado, 1990).

X. campestris pv. *malvacearum* (Xcm) é uma receptora pouco eficiente de fragmentos de DNA clonados. Apesar de Gabriel *et al.* (1986) terem isolados genes *avr* desta bactéria utilizando-se do vetor pSa747, DeFeyter *et al.* (1990) argumentam que a frequência de transferência para Xcm é baixa e que o vetor não era mantido de modo estável, a menos que se integrasse no cromossomo. Portanto, estes autores analisaram o comportamento de plasmídios dos grupos IncP (pLAFR3, pLAFR3::Tn5 e pVK102), IncQ (pKT210 e pKT230) e IncW (pSa747) neste patovar. Os plasmídios do grupo IncP e IncW são transferidos em baixa frequência e os do grupo IncQ apresentam altas taxas de mobilização, porém os fragmentos clonados sofrem deleções. Portanto, foram construídos plasmídios com o replicon do pSa747 e a região de mobilização *mobP* ou *mobQ*, o que elevou a taxa de transferência do pSa747 de 100 ou 1000 vezes, respectivamente. Como a região *mobQ* contém a origem de replicação, foi escolhido o pUFR008 (IncW, MobP) para dar continuidade ao trabalho. Foi inserido o locus de estabilização *parA* de *Agrobacterium* para estabilizar a construção, genes de resistência a antibióticos e o gene *lacZα* interrompido por um "polylinker". Os plasmídios resultantes foram denominados

pUFR027 (Km^r) e pUFR034 (Km^r, *cos*). Ambos são mobilizáveis para vários patovares, sendo que o pUFR027 apresenta alta estabilidade nos patovares campestris, vesicatoria, translucens e "*X. citri*", e estabilidade moderada no pv. phaseoli. Há apenas 4 sítios únicos de restrição em cada um deles.

Outros derivados IncW/MobP foram construídos, com pequenas alterações; por exemplo, pUFR043 (IncW, MobP, *lacZα*, *parA*, *cos*, Gm^r, Km^r, 5 sítios únicos); pUFR051 (semelhante a o pUFR043, porém com "polylinker" do pUC19 no *lacZα*), pUFR47 e pUFR042 (semelhantes ao pUFR027, porém Ap^r e Gm^r ou Km^r e Gm^r, respectivamente) (DeFeyter & Gabriel, 1991b; Swarup *et al.*, 1992; DeFeyter & Gabriel, 1991a). Além destes, o pUFR052 contém genes de metilases *XmaI* e *XmaIII*, eficientes para aumentar a frequência de transferência de DNA exógeno para *X. campestris* pv. malvacearum, contornando seu sistema de restrição (DeFeyter & Gabriel, 1991b).

A partir de um banco genômico construído no pUFR027 da linhagem 3213T de *X. citri* (patogênica para "grapefruit") em *X. campestris* pv. citrumelo, foi isolado o gene *pthA*, que aumenta a virulência dos pv. citrumelo, alfáfes e cyamopsidis para "grapefruit"; tornando-os avirulentos para seus hospedeiros compatíveis (respectivamente citrus, alfafa e "guar"). Em adição, o gene *pthA* não altera o fenótipo incompatível dos pv. phaseoli e malvacearum frente a "grapefruit", mas elicitava uma resposta hipersensitiva nos hospedeiros compatíveis (feijão e algodão) e é essencial para a patogenicidade de *X. citri*, o que foi verificado por mutagênese sítio-específica (Swarup *et al.*, 1991). Posteriormente, foi determinado que a avirulência deste gene para algodão apresenta especificidade para alguns cultivares e tem homologia com vários genes *avr* dos pv. vesicatoria e malvacearum, além de apresentar homologia com diversos outros patovares (Swarup *et al.*, 1992).

O pUFR034 foi utilizado como vetor em um banco genômico de *X. campestris* pv. *malvacarum* H, de onde foram isolados 6 genes de avirulência diferentes. Todos estes genes são plasmidiais e se apresentam ligados (DeFeyter & Gabriel, 1991a).

O pUFR027 foi utilizado na construção de um banco genômico da linhagem 317 de *X. campestris* pv. *vesicatoria* no laboratório de Genética de Microrganismos do CBMEG/UNICAMP (Marques, 1993). A partir deste banco, foram isolados genes envolvidos na fitopatogenicidade (Marques, 1993) e na produção do exopolissacarídeo (Destefano, 1994). Porém, estes trabalhos demonstraram uma das dificuldades em se lidar com este vetor, pois as preparações em pequena escala não apresentam bom rendimento, mesmo quando obtidas de *E. coli*. Em adição, o DNA resultante não pode ser eficientemente digerido com enzimas de restrição, a menos que seja realizado um ou mais passos de extração das impurezas com fenol-clorofórmio. Isto acarreta um maior gasto de tempo nos experimentos, em relação a trabalhos realizados em vetores do tipo ColE1, não funcionais em *X. campestris*.

3.4 Outros vetores.

A fim de se desenvolverem vetores de clonagem para *Xanthomonas*, foram clonados fragmentos *Bam*HI de um plasmídeo críptico de *X. citri*, o pXCL6, no vetor pBR328. Após transformação em *E. coli*, foram isolados 8 clones, transferidos por conjugação para *X. citri*. Apenas um dos clones foi transferido com sucesso, sendo denominado pBXC12 (Murooka *et al.*, 1987).

Apesar de vários autores afirmarem que plasmídios do grupo ColE1 não são capazes de se manter em *Xanthomonas* ou em outras bactérias fitopatogênicas (Ditta *et al.*, 1980; Turner *et al.*, 1984; Simon *et al.*, 1986), Murooka *et al.* (1987) relataram a introdução do pBR328 em *X. citri* IFO 3311, *X. campestris* pv. *campestris* NIAES 1076, pv. *oryzae* NIAES 1237 e pv. *translucens*, com eficiências variando de 8 a $7,7 \times 10^4$

transformantes/ μg DNA. Portanto, os autores afirmam que o pBXC12 deve se replicar com a *ori* do pBR325, sendo o fragmento originário de *Xanthomonas* responsável pela sua mobilização. Apesar de várias tentativas, no Laboratório de Genética de Microrganismos do CBMEG/UNICAMP, jamais se conseguiu transformar *X. campestris* com os plasmídios pBR322, pUC19 ou pBluescript II KS+, todos ColE1 (dados não publicados).

Alguns autores têm utilizado vetores de clonagem que não são compatíveis com *Xanthomonas*. Nesses casos, a análise é efetuada em *E. coli* (Hu *et al.*, 1992) ou por expressão transiente em *Xanthomonas* (Hötte *et al.*, 1990).

Um dos trabalhos isolou o gene de α -amilase a partir de um banco genômico no pUC13, sendo a seleção e análise do gene em *E. coli*. Porém, enquanto que em *X. campestris* a α -amilase é secretada no meio, em *E. coli* ela se localiza no periplasma (Hu *et al.*, 1992).

Outro trabalho é o de Hötte *et al.* (1990), que se utilizou do pSUP205. Este cosmídio se transfere para *X. campestris*, mas não se mantém nela. Um banco foi construído com o DNA genômico de uma linhagem selvagem em *E. coli* e mobilizado para mutantes de *X. campestris* deficientes na produção de exopolissacarídeo. A seleção foi feita visualmente nas placas resultantes da conjugação, e os clones foram retransferidos para *E. coli*. Foram isolados vários cosmídios com fragmentos sobrepostos, sendo o maior deles o pXCB1002, de 35,3 kb, contendo pelo menos 12 grupos de complementação.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Linhagens e plasmídios.

As linhagens de *Escherichia coli* e *Xanthomonas campestris* estão citadas nas Tabelas 2 e 3. As Tabelas 4 e 5 apresentam os plasmídios utilizados, sendo que a Tabela 5 contém o banco de grupos de incompatibilidade (Couturier *et al.*, 1988) cedido pelo Dr. Werner K. Maas, N.Y. As linhagens de *X. campestris* provenientes do Instituto Biológico de Campinas foram cedidas por Júlio Rodrigues-Neto. Os plasmídios construídos no decorrer do trabalho estão listados na Tabela 6. Os mapas do pBluescript II KS+ e do pKG1022 estão nas figuras 1 e 2, respectivamente.

TABELA 2. Linhagens de *Escherichia coli*.

Linhagem	Características	Fonte ou referência
DH5 α	<i>supE44 lacU169(80 lacZ M15)hsdR17 recA1 endA11 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan, 1983.
HB101	<i>supE44 supF58 hsdS3(r_{PM}P) recA13 ara- 14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>	Bolivar & Backman, 1979.

TABELA 3. Linhagens de *Xanthomonas campestris*.

Linhagem	Características	Fonte ou referência
pv. glycines		
333	patogênica para soja portadora de 2 plasmídios produtora de bacteriocina	I.B. - S.F.P. *
333 Sp ^r	resistente à espectinomicina portadora de 1 plasmídio de alto peso molecular	Oliveira, 1992.
pv. campestris		
Ca110	tipo selvagem	NRRL B - 1459. **
Ref. Sm ^r	mutante resistente à estreptomicina da Ca110	Destefano & Rosato, 1992.
8460	derivada da linhagem 8004 Rif ^r mutante para sistema de restrição	Atkins <i>et al.</i> , 1988.
pv. vesicatoria		
	patogênica para tomate e/ou pimentão	
317	tipo selvagem	I.B. - S.F.P. *
401	tipo selvagem sensível à bacteriocina da linhagem 333	I.B. - S.F.P. *
411	tipo selvagem sensível à bacteriocina da linhagem 333	I.B. - S.F.P. *
479	tipo selvagem	I.B. - S.F.P. *
479 Nal ^r	resistente a ácido nalidíxico	Marques, 1992.
pv. manihotis		
	patogênica para mandioca	
289	tipo selvagem	I.B. - S.F.P. *

*: Instituto Biológico, Seção de Fitobacteriologia Patológica, Campinas, S.P.

** : NRRL, Northern Regional Research Laboratories.

TABELA 4. Plasmídios.

Plasmídio	Características	Fonte ou referência
pKG1022	<i>parB bla(Ap^r) aphA(Km^r)</i> derivado P1	Gerdes, 1988.
pRK2073	<i>Tra⁺ Mob⁺ Sp^R</i>	Leong <i>et al</i> , 1988.
pBluescript II KS+	Ap ^r replicon pMB1	Stratagene.
pR40a	Ap ^r , Km ^r , Su ^r IncC	W.D.S. *
pR1	Ap ^r , Km ^r , Su ^r , Sm ^r , Cm ^r IncFII	W.D.S. *
pSU306	Ap ^r IncFIII	W.D.S. *
pR124	Tc ^r IncH	W.D.S. *
pR391	Km ^r IncJ	W.D.S. *
pN3	Sm ^r , Tc ^r , Su ^r IncN	W.D.S. *
pRP4	Tc ^r , Km ^r , Ap ^r IncP	W.D.S. *
pUI108	Sm ^r IncQ	W.D.S. *
pR478	Tc ^r , Km ^r , Cm ^r IncS	W.D.S. *
pUFR027	Km ^r IncW	DeFeyter <i>et al.</i> , 1990.

Abreviações: *Tra*, genes de transferência; *Mob*, locus de mobilização.

*: Wanderley Dias da Silveira, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, UNICAMP.

Obs: As abreviações dos antibióticos estão na Tabela 7.

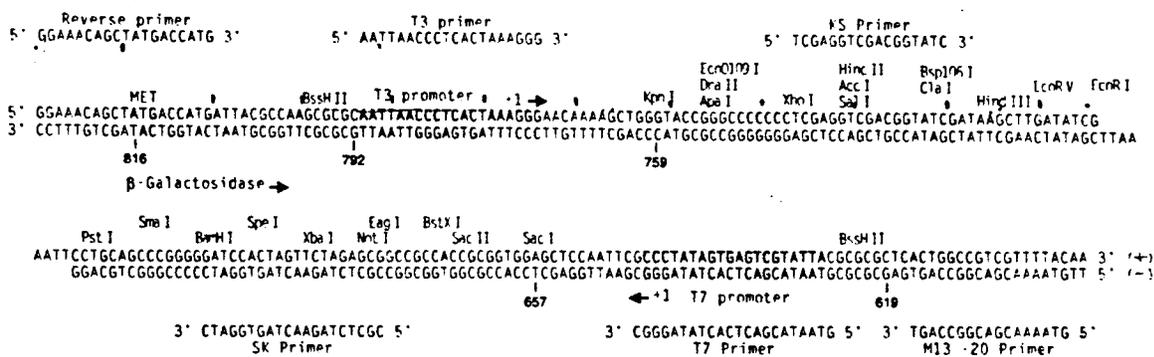
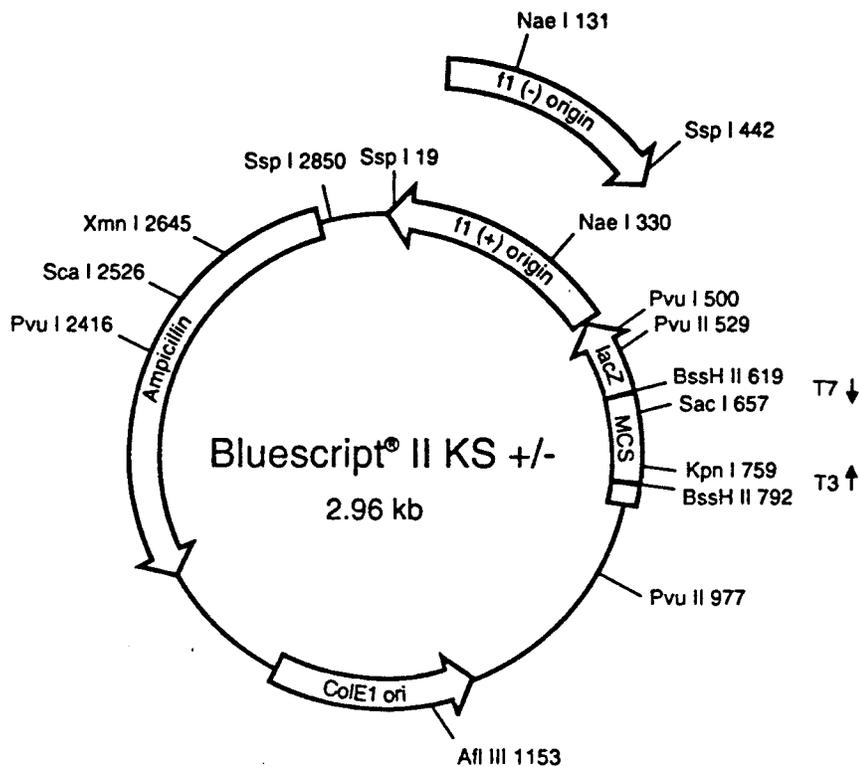
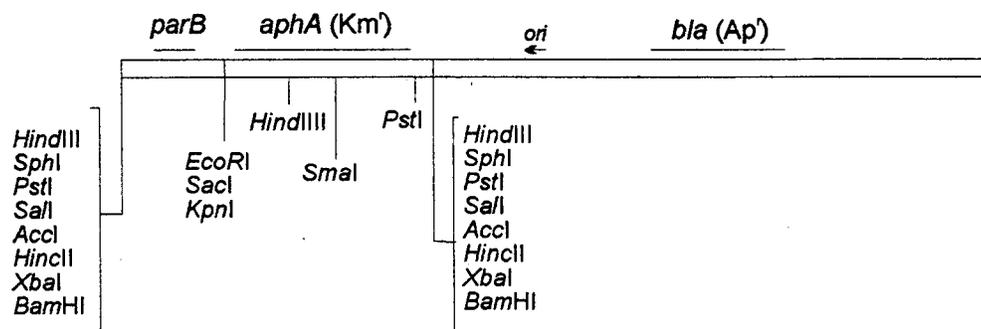


FIGURA 1. Mapa do vetor de clonagem p Bluescript KS + (Stratagene).



pKG1022
4,6 kb

FIGURA 2. Mapa do plasmídeo pKG1022 (Gerdes, 1988).

TABELA 5. Plasmídios contendo as sondas de grupos de incompatibilidade
(Couturier *et al.*, 1988).

Plasmídio	Sonda	Origem da sonda	Grupo de incompatibilidade
pULB2154	repFIA	F	IncFI
pULB2404	repFIB	P307	IncFI
pULB2440	repFIC	P307	IncFI
pULB2401	repFIIA	R1 <i>drd-19</i>	IncFII
pULB2422	rep9	pIP71	com9
pULB2428	repI1	R64 <i>drd-11</i>	IncI1
pULB2406	repB/O	pMU700	IncB/O
pULB2439	repK	R387	IncK
pULB2436	repHI1	TR6	IncHI1
pULB2433	repHI2	TP116	IncHI2
pULB2423	repL/M	pMU407.1	IncL/M
pULB2432	repN	R46	IncN
pULB2420	repP	RK2	IncP
pULB2424	repQ	R1162	IncQ
pULB2425	repT	Rts1	IncT
pULB2429	repU	RA3	IncU
pULB2426	repW	RSa	IncW
pULB2405	repX	R6K	IncX
pULB2410	repY	P1	IncY

Tabela 6. Plasmídios construídos neste trabalho.

Plasmídio	Tamanho	Marca de Resistência	Características
p333.1	1 741 pb	-	nativo de <i>X. campestris</i> pv. <i>glycines</i> 333
p1.3	3,9 kb	Ap ^r	fragmento <i>Sau3AI</i> de 983bp do p333.1 clonado no sítio <i>BamHI</i> do pBluescripKS+
pXG31	3,4 kb	Km ^r	p333.1 com o fragmento <i>parB aphA HincII</i> inserido em um sítio <i>HaeIII</i> funcional em <i>X. campestris</i>
pX310	4,7 kb	Ap ^r	fragmento <i>BamHI</i> de 1,8 kb do pXG31 clonado no sítio <i>BamHI</i> do pBluescript II KS + funcional em <i>X. campestris</i> e <i>E. coli</i>
pX320	4,7 kb	Ap ^r	inserto <i>XbaI</i> de 1,8 kb do pX310, com extremidades reparadas com Klenow e ligado ao sítio <i>SmaI</i> do pBluescript II KS + funcional em <i>X. campestris</i> e <i>E. coli</i>
pXG40	2,8 kb	Km ^r	fragmento <i>BamHI / EcoRI</i> de 1,8 kb do pX320 ligado ao fragmento <i>aphA</i> digerido com as mesmas enzimas funcional em <i>X. campestris</i>
pX402	3,8 kb	Km ^r	pXG40 contendo um fragmento <i>Sau3AI</i> do pBluescript IKS+ de 1030 bp no sítio <i>BamHI</i> funcional em <i>X. campestris</i> e <i>E. coli</i>
pX403	3,5 kb	Km ^r	pX402 com deleção de 288 bp entre os sítios <i>BamHI</i> e <i>PvuII</i> , localizados no fragmento proveniente do pBluescript IKS+ funcional em <i>X. campestris</i> e <i>E. coli</i>

Abreviações: pb, pares de base; Ap^r, resistência à ampicilina; Km^r, resistência à canamicina.

2. Meios e condições de cultura

As linhagens de *X. campestris* foram cultivadas em meio NYGB (Daniels *et al.*, 1984) ou YM (Haynes *et al.*, 1955), a 28-30°C e as de *E. coli* em meio completo LB (Miller, 1972) a 37°C. Para meios sólidos, foi acrescido 1,5% de ágar. Também foram utilizados os meios NA (extrato de carne 3g/l; peptona 5g/l e ágar 1,5%), para determinação de resistência ao íon cobre e meio de produção MPI (Sow & Demain, 1979), para as fermentações.

As concentrações de antibióticos usadas em meio sólido estão apresentadas na Tabela 7. Em meio líquido, utilizou-se a metade destas concentrações, exceto para ampicilina.

TABELA 7. Concentrações dos antibióticos em meio sólido. As abreviações estão entre parênteses.

Antibiótico	Concentração (µg/ml)
ácido nalidíxico (Nal)	50
ampicilina (Ap)	30
canamicina (Km)	25 (<i>X. campestris</i>) 50 (<i>E. coli</i>)
cloranfenicol (Cm)	25
espectinomicina (Sp)	50
estreptomicina (Sm)	100
gentamicina (Gm)	5
rifampicina (Rif)	100
tetraciclina (Tc)	10

Nas clonagens realizadas com o pBluescript II KS+ como vetor, foram adicionados ao meio 40µl de uma solução 20mg/ml de X-gal (5-Bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactosídeo), para a seleção de plasmídios recombinantes.

3. Extração de DNA.

3.1. DNA plasmidial.

A técnica utilizada foi a de lise alcalina (Birboim & Doly, 1979), de acordo com as modificações de Sambrook *et al.* (1989), em pequena e grande escala.

3.2. DNA cromossômico.

Uma colônia isolada de meio sólido foi ressuspensa em 1 ml de tampão T.E. (Tris - HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8). A suspensão foi centrifugada por três minutos em uma microcentrifuga, sendo o sobrenadante descartado. O precipitado foi suspenso em 0,1 ml de T.E. contendo proteinase K (50 µg/ml) e incubado em banho a 55°C por 15 minutos e, em seguida, a 80°C, também por 15 minutos. A suspensão foi novamente centrifugada por três minutos e o sobrenadante transferido para outro tubo, adicionando-se 400 µl de T.E. + Ribonuclease A (20 µg/ml). A concentração foi estimada por eletroforese em gel de agarose 0,7 %. Esta metodologia foi baseada em Young & Blakesley (1991).

4. Manipulação do DNA.

As digestões com enzimas de restrição e ligações foram efetuadas de acordo com as especificações dos fabricantes das enzimas, bem como as desfosforilações e geração de extremidades abruptas com o fragmento Klenow. As condições específicas de cada experimento serão descritas oportunamente, em **Resultados**.

As eletroforeses de plasmídios foram realizadas em gel de agarose 0,8 a 1,5%, em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM; EDTA 2mM). Para o isolamento de fragmentos ou plasmídios foram utilizados o kit GeneClean (Bio101 Inc.) ou gel de agarose de baixo ponto de fusão, segundo Berger & Kimmel (1987).

5. Transferência de plasmídios.

5.1. Transformação por métodos químicos.

As transformações de *E. coli* foram efetuadas segundo os métodos de Mandel & Higa (1970), Hanahan (1983) ou Nishimura *et al.* (1990), sendo este último o mais utilizado, por aliar alta eficiência e facilidade de obtenção das células competentes.

5.2. Eletrotransformação.

As células de *E. coli* ou *X. campestris* foram preparadas através de pequenas modificações da metodologia utilizada por White & Gonzales (1991), descritas em Ferreira *et al.* (1994). 100 ml de meio LB ou NYGB foram inoculados com 1 ml de uma cultura saturada das células receptoras e incubados até a fase mid-log, considerada A_{600} (absorbância a 600nm) entre 0,45 e 0,60 para *E. coli* e A_{640} entre 0,50 e 0,65 para *X. campestris*. A cultura foi centrifugada a 2800g por 15 minutos a 4°C, sendo o precipitado lavado 2 vezes em água bidestilada esterilizada gelada e ressuspenso em 30 ml de

glicerol 10% gelado. Os passos de ressuspensão e centrifugação foram repetidos por duas vezes, sendo o volume final de glicerol 10% igual a 10 ml. 40 a 80 µl foram aliquotados em tubos de microcentrifuga previamente resfriados, onde foi adicionado o DNA. A mistura foi então transferida para cubeta de 0,1 cm de distância entre os eletrodos e colocada na câmara do aparelho *E. coli Pulser* (BioRad). Foram utilizados pulsos de 18 kV/cm para *E. coli* e 12-18 kV/cm para *X. campestris*, com duração de 5 milissegundos. Imediatamente após o pulso, foi adicionado 1 ml de meio líquido (LB, NYGB ou YM) e as culturas incubadas por uma hora, sob agitação. Amostras foram retiradas e plaqueadas em meio seletivo.

5.3. Conjugação.

As conjugações foram efetuadas segundo DeFeyer *et al.*, 1990. O plasmídeo pRK2073 foi utilizado como "helper". As linhagens receptoras foram a 8460, Ref. Sm^F e 479 Na^F e, como doadora, a linhagem 333 contendo o pXG31 (333/pXG31).

6. Hibridização.

Para as hibridizações, foram utilizados filtros de náilon obtidos por transferência alcalina de plasmídios em gel de agarose (Sambroock *et al.*, 1989) ou por "colony-blot". A metodologia de "colony-blot" empregada foi baseada no manual do fabricante do kit "DIG" (Boehringer-Mannheim). Uma membrana de náilon foi colocada sobre uma placa de Petri contendo meio LB sólido e foram inoculadas as colônias sobre pontos previamente marcados com uma agulha. A placa foi incubada por 4 horas a 37°C. A membrana foi removida e colocada sobre um papel de filtro embebido em solução de desnaturação (NaOH 0,5M; NaCl 1,5M) por 5 minutos e neutralizada sobre papel de filtro embebido com Tris-HCl 1M pH 7,5; NaCl 1,5M por 5 minutos. A membrana foi lavada

por 5 minutos em S.S.C. 2x (NaCl 0,3 M, citrato trissódico 0,03M) com agitação suave, sendo seca sobre papel de filtro. O DNA foi ligado à membrana por exposição desta à luz ultravioleta de comprimento de onda de 254 nm por 3 minutos. O excesso de DNA foi removido por lavagem em S.S.C. 3x; S.D.S. 0,1% por 3 horas a 50°C.

As sondas foram marcadas não-radioativamente com digoxigenina, de acordo com as especificações do fabricante (Boehringer-Mannheim, FRG). A pré-hibridização, hibridização e lavagens dos filtros foram realizadas também segundo o fabricante do kit. A hibridização foi detectada com solução de coloração (NBT e X-fosfato) ou por sensibilização de filmes de raio-X por quimioluminescência, com o reativo Lumigem PPD (Boehringer-Mannheim, FRG).

7. Sequenciamento de DNA.

O plasmídeo p333.1 foi sequenciado usando-se fragmentos obtidos pela digestão parcial deste com a enzima *Sau3AI* e clonagem no pBluescriptKS+ ou por deleções unidirecionais do p1.3 ou do pX310. Para a descrição destes plasmídios, ver Tabela 5 ou o item 11 de Resultados.

Deleções unidirecionais foram obtidas com o kit "Double stranded nested deletion" (Pharmacia), ou com enzimas fornecidas pelo New England Biolabs, Böehringer-Mannheim ou Gibco-BRL, segundo a metodologia de Henikoff (1987).

As reações foram realizadas com os kits "T7 sequencing kit" (Pharmacia) ou com o "TaqTrack sequencing system, deaza" (Promega).

As eletroforeses foram realizadas em géis de poliacrilamida 5% (para sequências longas) e 6% (para sequências curtas), em tampão TBE (Tris-HCl 89mM; EDTA 2,5mM; ácido bórico 89mM, pH 8,3). Após a corrida, os géis foram fixados nas placas previamente tratadas com "bind-silane" (Sigma), sendo mantidos em solução de 10%

metanol : ácido acético por 30 minutos e reidratados em água corrente. Depois da secagem em estufa a 42°C, filmes de autoradiografia (Hyperfilm - MP, Amersham) foram colocados sobre os géis e os sistemas mantidos no escuro entre 4 e 7 dias, sendo revelados a seguir.

A análise das sequências obtidas foi feita com o auxílio do programa DNAsis (Pharmacia).

8. Análise do perfil proteico de linhagens contendo o p333.1 ou derivados.

Com o intuito de se verificar a existência de proteínas codificadas pelo p333.1, os perfis proteicos de linhagens contendo o p333.1 ou seu derivado pXG40 foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS - PAGE).

8.1. Extração de proteínas totais de *Xanthomonas*.

A metodologia empregada foi modificada da descrita por Vauterin *et al.* (1991). Cerca de 3 ml de uma cultura de bactérias crescida por 14 - 16 horas em NYGB foi centrifugado em uma microcentrífuga, ressuspendido em 400 µl de tampão PBS (Na₂HPO₄ 0,03M; KH₂PO₄ 0,016 M; NaCl 0,137 M) e centrifugado novamente. O tampão foi descartado e o procedimento repetido. O sedimento foi então suspendido em tampão de lise (Tris - HCl 0,6 M, β - mercaptoetanol 5 %, glicerol 10 %, pH 6,8), ao qual se adicionou SDS a uma concentração final de 2,8 %. A relação entre o volume de tampão de lise e a massa da amostra foi de 1 ml : 70 mg de bactéria. O tubo foi aquecido a 95°C por 10 minutos, transferido para gelo, centrifugado e o sobrenadante foi recuperado, sendo estocado a - 20° C. Foram carregados no gel de 7 a 10 µl de cada amostra.

8.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS - PAGE).

Foi utilizado gel de resolução com concentração de poliacrilamida em gradiente de 8 a 20 % e gel de empacotamento a 4%, segundo Laemmli (1970).

A eletroforese foi realizada na cuba Protean (BioRad) a 120 V até o tampão de amostra atingir o gel de resolução e, a seguir, a 160 V até o final da corrida, a temperatura ambiente, em tampão Tris - glicina (Tris-base 25 mM, glicina 0,192 mM e SDS 0,1%, pH 8,3). O marcador de peso molecular utilizado foi o "mid-range protein MW marker", Promega.

8.3. Coloração das proteínas por impregnação por prata.

A coloração das proteínas foi efetuada conforme a metodologia de Blum *et al.*, modificado (Tabela 8). As soluções foram preparadas imediatamente antes do uso.

O gel foi fotografado e seco num secador de géis a 80°C por 1 hora e 20 minutos, entre duas folhas de papel celofane.

TABELA 8. Sequência de tratamento do gel de poliacrilamida para a coloração de proteínas com prata.

Soluções	Tempo de tratamento
Fixadora (etanol 50%, ácido acético 12%, 50 ml/l de formaldeído 37%)	> 1 h
Etanol 50%	3 x 20 min
Solução de pré-tratamento (tiosulfato de sódio 0,02%)	1 min
Água destilada	3 x 20 s
Solução de impregnação (nitrato de prata, 0,2%, 0,75 ml/l de formaldeído 37%)	20 min
Água destilada	2 x 20 s
Solução reveladora (carbonato de sódio 6%, tiosulfato de sódio 0,4 mg% ; 0,5 ml/l de formaldeído 37%)	até o aparecimento das bandas
Água destilada	2 x 20 s
Solução de bloqueio (etanol 50%, ácido acético 12%)	10 min
Etanol 50 %	> 20 min

9. Estabilidade dos plasmídios pXG31 e pXG40 em *X. campestris*.

9.1. Estabilidade durante cultura em meio líquido.

Foi feito um pré-inóculo a partir de uma colônia isolada em 5 ml de meio NYGB contendo canamicina, incubado a 28°C, sob agitação, durante a noite. O inóculo foi feito a partir de 1,5 ml dessa cultura em 20 ml de meio NYGB sem a adição de antibiótico. A absorbância a 640 nm foi medida em espectrofotômetro e uma amostra de 10 µl foi diluída e plaqueada em meio contendo ou não canamicina, em duplicata. As culturas foram então

incubadas a 28° C sob agitação, sendo retiradas amostras em intervalos de três horas, até 27 horas a partir do inóculo.

O número de unidades formadoras de colônia (u.f.c.) foi determinado nas placas com e sem antibiótico, para cada plasmídio, em cada tempo de incubação. A média entre os números obtidos foram utilizados para construir gráficos de u.f.c./ml por tempo de cultura. A estabilidade é dada pela diferença entre o u.f.c./ml em meio sem antibiótico (onde crescem todas as células presentes) e do meio com antibiótico (onde crescem apenas as células portadoras de plasmídio).

9.2. Estabilidade durante fermentação.

Foram feitos pré-inóculos das linhagens em 5 ml de meio NYGB com canamicina, com crescimento por cerca de 14 - 16 horas. A absorbância a 640 nm dos inóculos foi padronizada para 1. 2 ml da suspensão obtida foram transferidos para 20 ml de meio de produção I -MPI (Sow & Demain, 1979). A incubação foi realizada a 28°C e 180 rpm, por 72 horas.

Foram retiradas alíquotas de 10 µl de cada erlenmeyer ao início e ao final do experimento (72 horas de fermentação). Estas alíquotas foram diluídas e plaqueadas em meio NYGB com ou sem canamicina, conforme o sub-ítem anterior.

9.3. Estabilidade durante teste de fitopatogenicidade em sementes de tomate.

O teste de fitopatogenicidade foi realizado de acordo com o apresentado no sub-ítem 11.2. Após 14 dias do tratamento, os sintomas foram avaliados e três plântulas de cada um dos tratamentos (exceto com a linhagem 333) foram maceradas em 1 ml de solução salina. A suspensão obtida foi diluída e plaqueada em meio NYGB com e sem canamicina, para a determinação do número de u.f.c./plântula.

10. Estimativa do número de cópias do p333.1.

Foram extraídos plasmídios a partir de 1 ml de uma cultura saturada, em seis repetições. O DNA do p333.1 obtido de três destas foi quantificado visualmente em gel de agarose, por comparação com um plasmídio linearizado (pBR328), em concentrações de 50, 100, 150, 200, 300 e 400 ng por canaleta. O número de moléculas em 1 ml de cultura foi calculado com base na seguinte equação:

$$\text{n}^{\circ} \text{ de moléculas} = \frac{m \times \text{n}^{\circ} \text{ de Avogrado}}{\text{P.M.}}$$

onde: m = massa observada do plasmídio em gramas, correspondente a 1 ml de cultura

$$\text{n}^{\circ} \text{ de Avogrado} = 6,02 \times 10^{23} \text{ moléculas}$$

$$\text{P.M.} = \text{peso molecular em daltons (g/ mol)} = \text{bp} \times 660$$

Uma amostra da cultura da qual foram extraídos os plasmídios foi diluída e plaqueada, a fim de se contar o número de u.f.c./ml. Com base nestes dados, pôde-se estimar o número de cópias por célula pela relação:

$$\text{n}^{\circ} \text{ de cópia} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de moléculas}}{\text{u.f.c./ml}}$$

11. Testes de fitopatogenicidade.

Os testes foram realizados em plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum*) cultivar Petomech VF 1&2, procedente da Petoseed Co., Inc. O objetivo destes testes foi verificar se os plasmídios derivados da linhagem 333 de *X. campestris* pv. *glycines* ocasionavam mudança da resposta de patogenicidade da linhagem 317, patovar vesicatoria, compatível para tomateiro.

11.1. Teste em plantas adultas.

As plantas foram crescidas ao ar livre, em terra adubada. Após quatro a seis semanas, foram transferidas para o laboratório, mantidas umedecidas e inoculadas após um dia.

As culturas de células das linhagens bacterianas utilizadas como inóculo foram crescidas em meio NYGB por 14 a 16 horas sob agitação e diluídas no mesmo meio até A_{640} de 0,5, correspondendo a aproximadamente $1,5 \times 10^9$ células / ml. A inoculação foi feita por infiltração na superfície inferior das folhas com uma seringa de 1 ml, até que houvesse um encharcamento do ponto. Foram feitos de quatro a seis pontos de inoculação para cada linhagem, uma folha por linhagem, com repetição em duas plantas. O procedimento foi repetido com meio NYGB, como controle negativo.

As plantas foram então regadas e envolvidas em sacos plásticos transparentes, para manter a umidade, favorecendo o aparecimento dos sintomas, que foram observados após três dias da inoculação.

11.2. Teste em sementes.

As sementes foram colocadas em frasco contendo cerca de 10 ml de água destilada esterilizada com uma gota de detergente comum e 1 ml de hipoclorito de sódio comercial e foram agitadas, sendo depositadas em uma peneira esterilizada e lavadas com água, até a retirada total do detergente e do hipoclorito. A seguir, foram transferidas para placas de Petri.

O inóculo de 10 ml foi feito a partir de células recuperadas por centrifugação (2800g, 15 minutos) de uma cultura crescida por 14 - 16 horas em meio NYGB. O sedimento celular foi diluído em solução salina (NaCl 0,9%) até $A_{640} = 0,2$. As placas contendo as sementes em contato com a suspensão bacteriana foram vedadas com filme de PVC e incubadas a 28°C sob leve agitação, por uma hora.

As sementes tratadas desta maneira foram então transferidas para formas de minigelo esterilizadas por autoclavagem (121°C/20 min), contendo meio de germinação M.S. (Murashine & Skoog, 1962) com 1% de ágar. Estas formas possuem 16 colunas com 7 fileiras de compartimentos de aproximadamente 1 cm³, sendo deixada uma coluna vazia entre cada linhagem testada. As formas foram colocadas em caixas de plástico previamente descontaminadas com álcool, contendo 10 a 20 ml de água esterilizada, sendo cobertas com filme de PVC e envoltas em sacos plásticos transparentes.

As caixas foram colocadas em câmara de crescimento (Forma Scientific), com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 8 horas de escuro. Os sintomas foram observados após 12 dias da inoculação.

12. Fermentação e medida de viscosidade.

Foram realizadas fermentações para se verificar se os derivados do p333.1 acarretam mudanças na produção de goma xantana de uma linhagem com alta produtividade. Foi utilizada a metodologia descrita no item 9.2 de **Material e Métodos**.

Após 72 horas, a viscosidade do caldo foi medida em viscosímetro Brookfield (modelo RTV), utilizando-se 9 ml do mesmo, "spindle" 21 e rotações de 20, 50 e 100 rpm, por 15 segundos.

13. Teste de produção de bacteriocina.

A metodologia empregada foi baseada em Vidaver *et al.* (1972). As linhagens potencialmente bactericinogênicas foram inoculadas por ponto em placas de NYGB sólido, com crescimento por 24 horas e lisadas por vapor de clorofórmio. As linhagens sensíveis, 401 e 411, foram crescidas em meio líquido durante a noite e 0,3 ml da cultura misturados a 5 ml de meio NYGB semi-sólido (0,4% de ágar), que foram espalhados sobre as placas. Após 24 h de incubação a 28°C, foi observada a presença de halo de inibição de crescimento das bactérias sensíveis.

As linhagens testadas foram as derivadas de *X. campestris* 289, 317, Ca110 e 8460, contendo os plasmídios pXG31 e pXG40. Os controles positivos foram a 333 selvagem, 333/pXG31 e 333/pXG40 e, os negativos, as linhagens selvagens.

RESULTADOS

1. Perfil plasmidial da linhagem 333 de *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*.

X. campestris pv. *glycines* 333 é portadora de dois plasmídios, sendo um de alto e um de baixo peso molecular. O plasmídio de alto peso molecular (cerca de 25 kb) foi digerido com as enzimas *Ava*I, *Bam*HI, *Eco*RI, *Pst*I, *Sau*3AI e *Sal*I (Oliveira, 1993) e não apresentou sítios para a enzima *Hind*III. O plasmídio menor, de 1,7 kb, denominado neste trabalho de p333.1, não apresentou sítio para nenhuma dessas enzimas, exceto *Sau*3AI, além de *Acc*I, *Eco*RV, *Hinc*II, *Kpn*I, *Sac*I, *Sma*I, *Sph*I, *Xba*I e *Xho*I. Apresentou 5 sítios para a enzima *Sau*3AI, sendo que um deles foi determinado apenas pela análise da sequência (item 14), já que o fragmento originado não foi detectado em gel de agarose ou por hibridização, devido ao tamanho reduzido. Os fragmentos originados por digestão com essa enzima foram denominados A, B, C, D e E e apresentaram 993, 372, 175, 136 e 65 pares de base, respectivamente. Também apresentou sítios para *Hae*III e apenas 1 para *Pvu*II.

2. Introdução de um marcador de resistência à canamicina no p333.1.

2.1. Construção de subclones *Sau*3AI.

Inicialmente, o fragmento *Sau*3AI de cerca de 1 kb do p333.1 foi clonado no sítio *Bam*HI do vetor pBluescript IIKS+, originando o p1.3 (Figura 3). Apenas um dos sítios *Bam*HI foi regenerado na ligação, sendo o inserto liberado com digestão com *Bam*HI e *Eco*RI e não com *Bam*HI / *Xba*I, indicando que o sítio reconstituído foi o da direita, tomando-se como base o mapa linear do vetor (Figura 1). A origem do inserto clonado foi

confirmada por marcação deste com digoxigenina e hibridização com os plasmídios da linhagem 333, sendo que apenas o p333.1 foi hibridizado, conforme o esperado.

Outros subclones foram obtidos da digestão parcial do p333.1 com a enzima *Sau3AI*. Os fragmentos obtidos foram ligados ao vetor pBluescript IISK+ digerido com *BamHI*. Amostras foram utilizadas para transformar células competentes de DH5 α , sendo obtidos inúmeros transformantes.

Foram analisadas 18 colônias quanto ao perfil de restrição, sendo 10 selecionadas (Figura 3). Liberaram inserto com a digestão dupla *BamHI* / *XbaI* os clones 1, 10, 17, 18, 19 e 20; e com *BamHI* / *EcoRI*, os clones 5, 6, 12 e 13. Os tamanhos estimados dos insertos variaram de cerca de 1800 a 300 bp. O clone 19 apresentou duas bandas.

Para se verificar quais bandas *Sau3AI* estavam presentes em cada um dos clones, seus plasmídios foram digeridos com esta enzima. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e transferidos para um membrana de náilon e hibridizados. A sonda consistiu do p333.1 intacto, marcado com digoxigenina.

Da análise do luminograma obtido, verificou-se que clone 13 contém todo o p333.1 e os clones 5, 17 e 18 são iguais ao p1.3 (banda denominada de A). Os clones 6 e 10 apresentaram o mesmo padrão, contendo a banda B, sendo que o clone 10 deve possuir o fragmento B ligado *in tandem*, apresentando inserto maior quando digerido com *BamHI* e *XbaI*. O clone 19, aparentemente, também contém apenas a banda B. O clone 1 apresentou as bandas A e D, o clone 12, as bandas B e D e o 20, as bandas B, C e D. Como não foram encontrados clones contendo apenas as bandas C ou D separadamente, foram analisadas mais 18 colônias, isolando-se, então, os clones 26 (banda C) e 23 (D). O fragmento E (65 bp) não foi detectado por este procedimento.

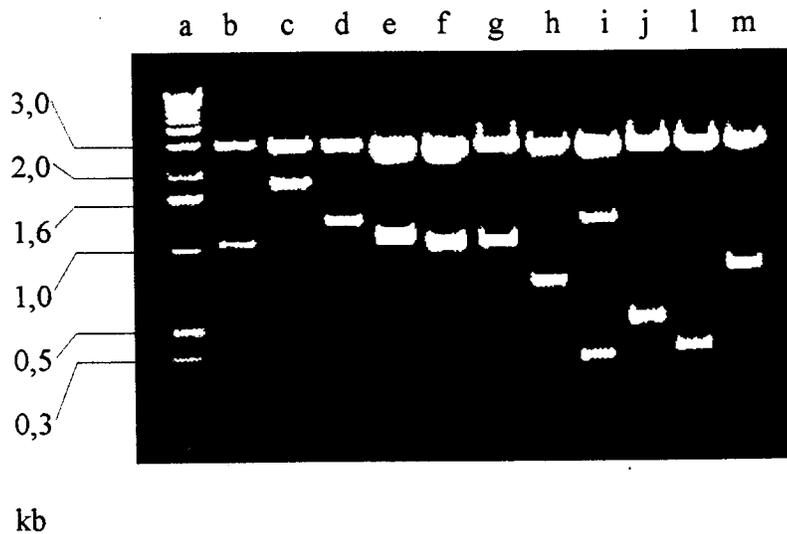


FIGURA 3. Perfil de restrição dos clones obtidos da ligação de fragmentos p333.1 obtidos por digestão com *Sau3AI* e ligados ao pBluescript IIKS+ / *Bam*HI.

- | | |
|--|--------------------------------------|
| a. "ladder" de 1 kb. | g. 5 <i>Bam</i> HI / <i>Eco</i> RI. |
| b. p1.3 <i>Bam</i> HI / <i>Eco</i> RI. | h. 10 <i>Bam</i> HI / <i>Xba</i> I. |
| c. 13 <i>Bam</i> HI / <i>Eco</i> RI. | i. 19 <i>Bam</i> HI / <i>Xba</i> I. |
| d. 1 <i>Bam</i> HI / <i>Xba</i> I. | j. 12 <i>Bam</i> HI / <i>Eco</i> RI. |
| e. 17 <i>Bam</i> HI / <i>Xba</i> I. | l. 6 <i>Bam</i> HI / <i>Eco</i> RI. |
| f. 18 <i>Bam</i> HI / <i>Xba</i> I. | m. 20 <i>Bam</i> HI / <i>Xba</i> I. |

2.2. Ligação dos fragmentos *Sau3AI* ao marcador de resistência à canamicina.

O plasmídeo do clone 20 foi digerido com *Bam*HI / *Xba*I e os dos clones 12 e 13 foram digeridos com *Eco*RI / *Xba*I. Estes plasmídios foram escolhidos por apresentarem combinações diferentes de bandas, conforme descrito no item anterior. Os fragmentos originários do p333.1 foram separados do vetor e ligados ao marcador de resistência à canamicina (*aphA*) do pKG1022 digerido com *Bam*HI / *Xba*I ou com *Bam*HI / *Eco*RI. Os sistemas de ligação foram utilizados para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α , sem que se obtivessem transformantes. Todo o procedimento foi repetido mais duas vezes, transformando-se DH5 α por eletroporação, igualmente sem sucesso. Em uma das tentativas, também se realizou a eletroporação de *X. campestris* pv. *campestris* 8460, com resultados negativos.

Devido aos insucessos desses experimentos, o p333.1 foi extraído da linhagem 333 e foi digerido parcialmente com *Sau3AI*. Os fragmentos resultantes, após inativação e retirada da enzima, foram ligados ao fragmento *parB* / *aphA* proveniente do pKG1022 digerido com *Bam*HI. Além da resistência à canamicina conferida pelo gene *aphA*, este fragmento continha o locus de estabilização de plasmídeo *parB*. Procedeu-se então à eletrotransformação de *E. coli* DH5 α , sem que se obtivessem colônias resistentes à canamicina.

2.3. Construção do pXG31 e derivados.

Em face das dificuldades encontradas em relação à manutenção autônoma dos clones descritos no item acima, tanto em *E. coli* quanto em *X. campestris*, procurou-se uma nova estratégia, utilizando-se a enzima *Hae*III para a digestão parcial do p333.1.

Para tanto, foi realizada uma cinética de reação com esta enzima (sequência de reconhecimento GG/CC, gerando extremidades abruptas). Cerca de 2 µg de DNA foram incubados a 37°C com 10 unidades de *Hae*III (New England Biolabs), num volume de 25 µl. Aliquotas foram retiradas após 3, 5, 10 15 e 20 minutos de reação e mantidas em gelo, com 5 mM de EDTA. Aos 3 minutos, já não foi detectado material intacto, havendo uma banda mais intensa de 1,8 kb (plasmídeo linearizado) e um rastro de DNA, sendo os menores fragmentos de aproximadamente 200 bp. A partir de 5 minutos, a banda de 1,8 kb foi perdendo a intensidade, demonstrando uma digestão mais efetiva.

A reação foi então repetida nas mesmas condições, sendo paralisada aos três minutos. 200 ng do DNA foram ligados ao fragmento marcador *parB aphA* digerido com *Hinc*II, que também origina extremidades abruptas. Células competentes de *E. coli* DH5α foram transformadas com uma alíquota do sistema de ligação, sem se obter transformantes. Procedeu-se então à eletrotransformação desta mesma linhagem e de *X. campestris* pv. *glycines* 333. Foi detectada apenas uma colônia Km^r da linhagem 333.

Esta colônia teve seus plasmídios extraídos e analisados em gel de agarose. Através da comparação do perfil de plasmídios deste clone com a linhagem original, pôde ser observada a manutenção do plasmídeo de alto peso molecular e a substituição das duas bandas de baixo peso molecular da linhagem 333 por uma banda de tamanho intermediário (Figura 5A, canaletas h e i). A digestão deste último plasmídeo com *Bam*HI resultou em apenas uma banda entre 1,6 e 2 kb, que corresponde a dois fragmentos tamanhos equivalentes, correspondendo um ao marcador *parB / aphA* e outro ao fragmento originário do p333.1. Na digestão dupla *Bam*HI/*Eco*RI, este dado foi confirmado, sendo liberadas uma banda de aproximadamente 1,8 kb, uma de 1 e a terceira de 0,5 kb, sendo que os tamanhos das duas últimas conferem com os esperados para o marcador. Este plasmídeo foi denominado pXG31 (Figura 4).

Foram feitas três tentativas de transferi-lo para *E. coli* DH5 α ou HB101, sem sucesso.

O pXG31 foi digerido com *Bam*HI e oi ligado ao mesmo sítio do pBluescript II KS+. Devido ao tamanho semelhante entre o fragmento marcador e o originário do p333.1, 50 das colônias brancas Ap^r foram transferidas para uma membrana de náilon e hibridizadas com o p333.1 marcado com digoxigenina. Após detecção por quimioluminescência, 6 colônias mostraram forte reação positiva, sendo uma delas escolhida para a extração do plasmídio recombinante, que foi denominado pX310 (Figura 4). Este plasmídio foi transferido para as linhagens 333 e 479, o que foi confirmado por análise dos plasmídios em gel de agarose. A linhagem 333 perdeu apenas o p333.1 e a 479 não sofreu modificação em seu perfil, exceto pela inclusão do pX310.

Para se obter um plasmídio sem o locus de estabilização, foi realizado um passo de clonagem no pBluescript II KS+, a fim de se obter o fragmento do p333.1 flanqueado por um sítio *Bam*HI e um *Eco*RI. Assim, liberou-se com *Xba*I o inserto do pX310, reparando-o com a enzima Klenow + dNTP's e ligando-o novamente ao vetor pBluescript II KS+, desta vez no sítio *Sma*I, originando o pX320 (Figura 4). O pX320 foi digerido com *Eco*RI e *Bam*HI, liberando o inserto, que foi ligado ao fragmento *aphA* (Km^r) do pKG1022 digerido com as mesmas enzimas. Deste modo, foi construído e selecionado em *X. campestris* pv. *campestris* 8460 o pXG40, que é similar ao pXG31, porém sem o locus de estabilização *parB* (Figuras 4 e 5).

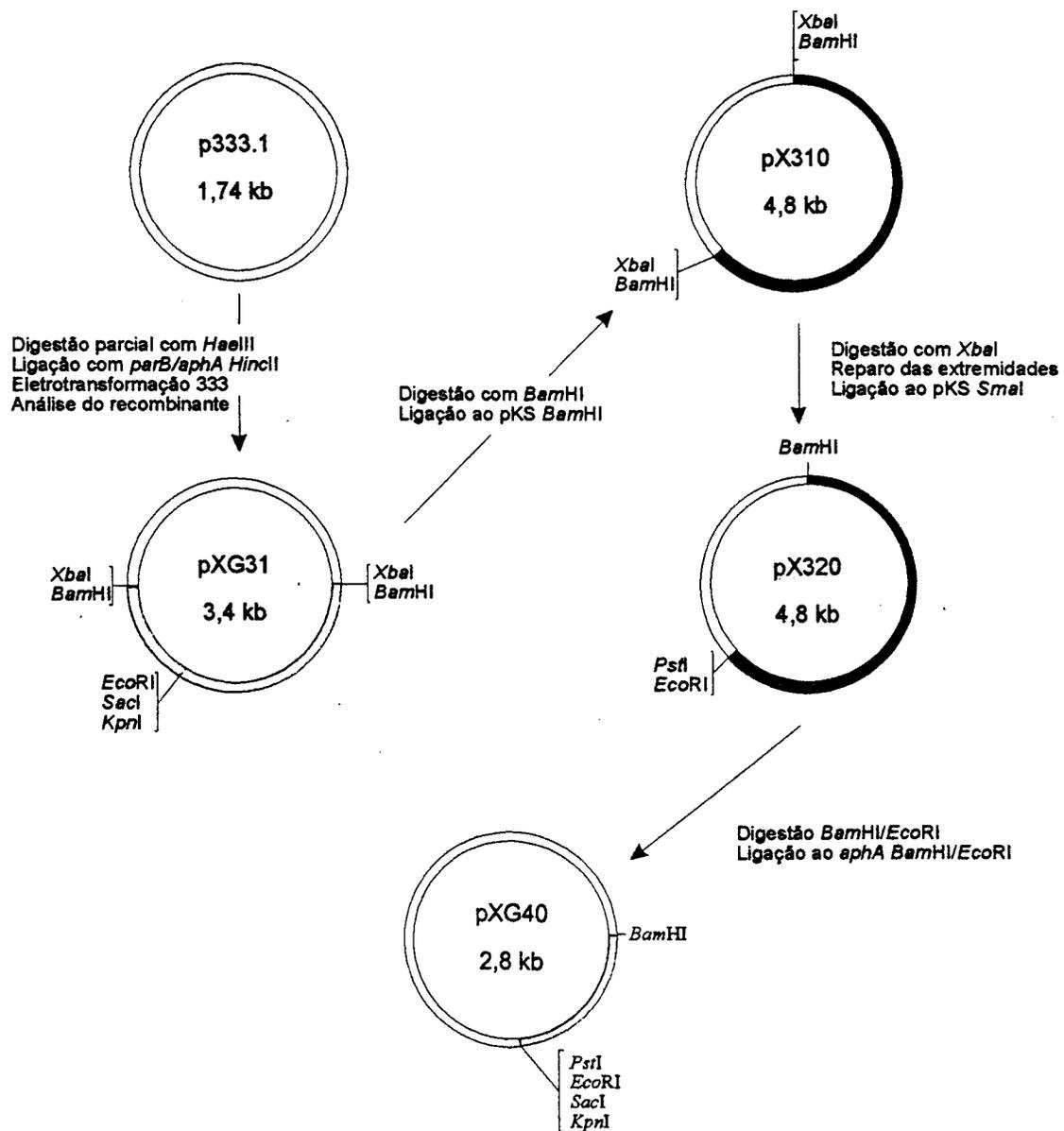


FIGURA 4. Construção dos plasmídios pXG31 e pXG40. Os tamanhos dos plasmídios não estão mostrados em escala.

3. Capacidade conjugativa do pXG31.

A capacidade de conjugação do pXG31 foi testada através de cruzamentos triparentais da linhagem 333/pXG31 com as receptoras 289 Nal^r, Ref. Sm^r ou 8460 e o "helper" pRK2073, sendo que não foram observados transconjugantes em nenhum dos cruzamentos realizados. Este resultado indica que o pXG31 não é mobilizável.

4. Introdução dos plasmídios pXG31 e pXG40 em outras linhagens de *Xanthomonas campestris*.

Os pXG31 e pXG40 foram transferidos por eletrotransformação às linhagens de *X. campestris* mais comumente utilizadas em trabalhos deste laboratório. Eles foram introduzidos com sucesso em todos os experimentos realizados, nas linhagens 289, 317, 479, Ca110 e 8460, além da linhagem 333 original. Como pode ser observado na Figura 5A, apenas o p333.1 não coexiste com seus derivados na mesma célula, sendo que nenhum plasmídio nativo das linhagens 289 e 479 foi eliminado pelos pXG's.

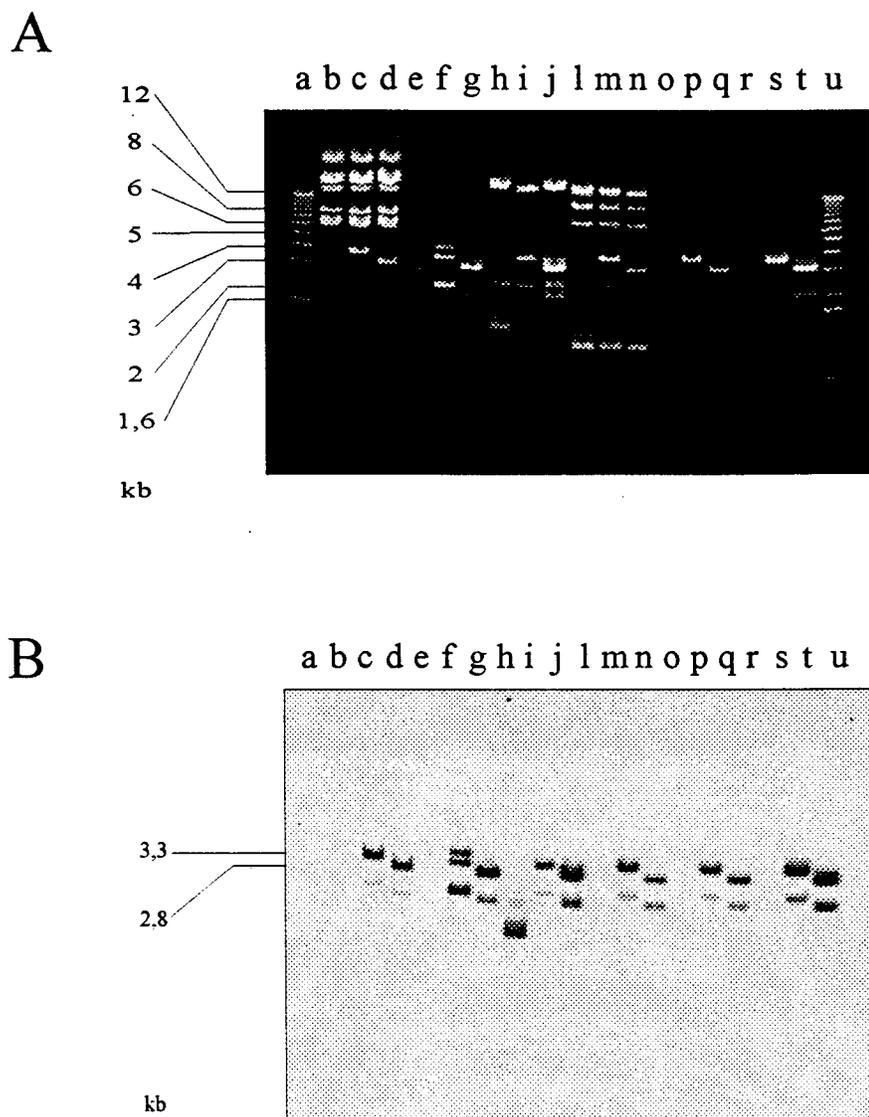


FIGURA 5. Plasmídios derivados do p333.1 em diferentes linhagens de *X. campestris*; digeridos com *EcoRI*. A. Gel de agarose 1,5% . B. Luminograma após hibridização com o p333.1 marcado.

- | | |
|----------------------|----------------------|
| a. "ladder" de 1 kb. | l. 479. |
| b. 289. | m. 479 / pXG31. |
| c. 289 / pXG31. | n. 479 / pXG40. |
| d. 289 / pXG40. | o. Ca110. |
| e. 317. | p. Ca110 / pXG31. |
| f. 317 / pXG31. | q. Ca110 / pXG40. |
| g. 317 / pXG40. | r. 8460. |
| h. 333. | s. 8460 / pXG31. |
| i. 333 / pXG31. | t. 8460 / pXG40. |
| j. 333 / pXG40. | u. "ladder" de 1 kb. |

5. Homologia do p333.1 com outras linhagens de *Xanthomonas campestris*.

5.1. Homologia com DNA plasmidial.

Para se verificar a existência de sequências presentes tanto no p333.1 quanto em plasmídios de outras linhagens de *X. campestris*, o DNA gel representado na Figura 5A foi transferido para uma membrana de náilon e hibridizado com o p333.1 marcado com digoxigenina. O luminograma correspondente (Figura 5B), demonstra a hibridização da sonda apenas com os derivados do p333.1 e com ele próprio, na linhagem original. A presença de mais de uma banda por canaleta no luminograma ocorreu devido à presença de DNA plasmidial não digerido, em formas topológicas diferentes, especialmente na canaleta f.

5.2. Homologia com DNA cromossômico.

A fim de se verificar se o p333.1 contém sequências presentes também no DNA cromossômico de *X. campestris*, procedeu-se à extração do DNA total das linhagens 289, 317, 333, 479, Ca110 e 8460. Após digestão com *EcoRI*, os fragmentos resultantes foram separados em gel de agarose 0,8%, transferidos para membrana de náilon por "Southern blot" e hibridizados com o p333.1 marcado com digoxigenina. Não foi observada hibridização com DNA cromossômico de nenhuma das linhagens, apenas com as bandas correspondentes ao próprio p333.1 intacto, na linhagem 333.

6. Hibridização do p333.1 com plasmídios de grupos de incompatibilidade de *Escherichia coli*.

6.1. "Colony-blot" de alguns plasmídios.

Linhagens de *E. coli* portadoras de plasmídios de 11 grupos de incompatibilidade diferentes (plasmídios pR40a, pR1, pSU306, pR124, pR391, pN3, pRP4, pUI108, pR478, pUFR027 e pBluescript II KS+, respectivamente dos grupos IncC, IncFII, IncFIII, IncH, IncJ, IncN, IncP, IncQ, IncS, IncW e ColE1; Tabela 4) foram crescidas diretamente em uma membrana de náilon sobre uma base de meio LB sólido. Utilizou-se como controle positivo a linhagem DH5 α portadora do pX310. Após o tratamento descrito em Material e Métodos (item 6), o DNA ligado à membrana foi hibridizado com o p333.1 marcado com digoxigenina. Nenhuma das linhagens apresentou reação positiva, exceto o controle.

6.2. Hibridização com um banco de sondas de diferentes grupos de incompatibilidade.

Na ausência de homologia com os plasmídios citados no item anterior, foi utilizado o banco de sondas de grupos de incompatibilidade construído por Couturier *et al.* (1988). Este banco consiste de 19 plasmídios, denominados pULB (Tabela 5), cujos insertos representam regiões determinantes de incompatibilidade clonadas, que podem ser extraídos por digestão com as enzimas de restrição apropriadas. Por ser apenas um plasmídio a ser hibridizado com as 19 sondas, optou-se por utilizar um filtro de náilon obtido por "Southern blot" de um gel de agarose contendo os 19 plasmídios digeridos e, como sonda, o p333.1 marcado com digoxigenina.

Após hibridização, lavagem e detecção realizadas de acordo com o descrito no item 6 de Material e Métodos, não foi observada reação positiva com nenhum dos grupos

de incompatibilidade, sendo apenas reveladas as bandas do controle positivo, que consistiu dos plasmídios intactos da linhagem 333.

7. Estimativa do número de cópias do p333.1.

A partir de 1 ml de cultura, foram extraídos cerca de 50 ng do p333.1 (Figura 6), em três repetições. Neste mesmo volume, foram contadas $1,2 \times 10^9$ u.f.c.. Procedendo-se aos cálculos apresentados em Material e Métodos, obteve-se a estimativa de 21 cópias por célula.

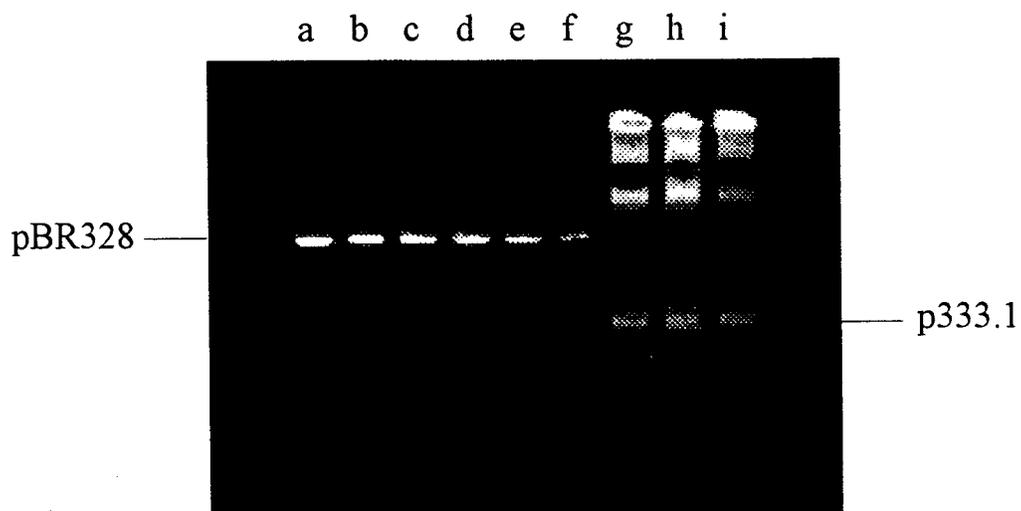


FIGURA 6. Estimativa da concentração de DNA do p333.1 obtida de 1 ml de cultura da linhagem 333 para a estimativa do número de cópias.

a. até f. Concentrações decrescentes do pBR328, utilizado como padrão.

a. 400 ng.

b. 300 ng.

c. 200 ng.

d. 150 ng.

e. 100 ng.

f. 50 ng.

g.; h. e i. Quantidade de DNA plasmidial da linhagem 333 extraído de 1 ml de cultura, em cada canaleta.

8. Estabilidade do pXG31 e pXG40 em *Xanthomonas*.

Os plasmídios pXG31 e pXG40, respectivamente com e sem o locus de estabilização *parB*, foram testados quanto a sua estabilidade em diferentes condições de crescimento.

8.1. Estabilidade durante crescimento em meio líquido.

Neste experimento, foram utilizadas as linhagens derivadas de *X. campestris* pv. vesicatoria 317, contendo os plasmídios pXG31 e pXG40 (317/pXG31 e 317/pXG40).

Os resultados obtidos estão apresentados no gráfico da Figura 7, onde se pode observar que o pXG31 e o pXG40 se mantiveram estáveis no decorrer de 27 horas de crescimento em meio seletivo. Isto indica que o p333.1 possui um sistema de estabilidade próprio, independente da presença do *parB*. Cada ponto do gráfico corresponde à média de duas contagens de células após diluição e plaqueamento.

Os pontos correspondente a 21 horas de crescimento foram omitidos do gráfico devido a erros na diluição para a contagem das u.f.c.. Porém, os valores encontrados estão próximos entre si para cada plasmídio, em cada tempo de crescimento. Assim, houve apenas uma distorção em relação à curva, mas não em relação ao número de colônias em placas com ou sem antibiótico, indicando a mesma taxa irrelevante de perda dos pXG's.

8.2. Estabilidade durante a fermentação.

As linhagens utilizadas foram a Ca110 selvagem e contendo o pXG31 e o pXG40 (Ca110/pXG31 e Ca110/pXG40) e a linhagem 289 contendo os dois plasmídios (289/pXG31 e 289/pXG40).

Os plasmídios pXG31 e pXG40 não foram perdidos das linhagens Ca110 e 289 nas condições do experimento, em que não havia nenhum tipo de pressão seletiva (Figura 8). O número de u.f.c./ml no início do experimento também foi determinado, a fim de se

verificar se todas as células presentes no inóculo possuíam realmente os plasmídios, o que foi confirmado (dados não mostrados). Cada barra do gráfico corresponde à média de três repetições, ou seja, para cada tratamento foram realizadas três fermentações independentes.

8.3. Estabilidade *in planta* durante teste de sementes.

Foram utilizadas as linhagens 317, 317/pXG31, 317/pXG40 e 333. Como controle negativo, as sementes foram tratadas com solução salina.

As linhagens 317/pXG31 e 317/pXG40 não perderam seus plasmídios, ao final de 14 dias de inoculação em sementes de tomate (Figura 9). O controle realizado com a linhagem 317, da qual não foi observada nenhuma colônia Km^r, demonstra que a resistência ao antibiótico canamicina é resultante da presença dos plasmídios e não de outros fenômenos, tais como mutação.

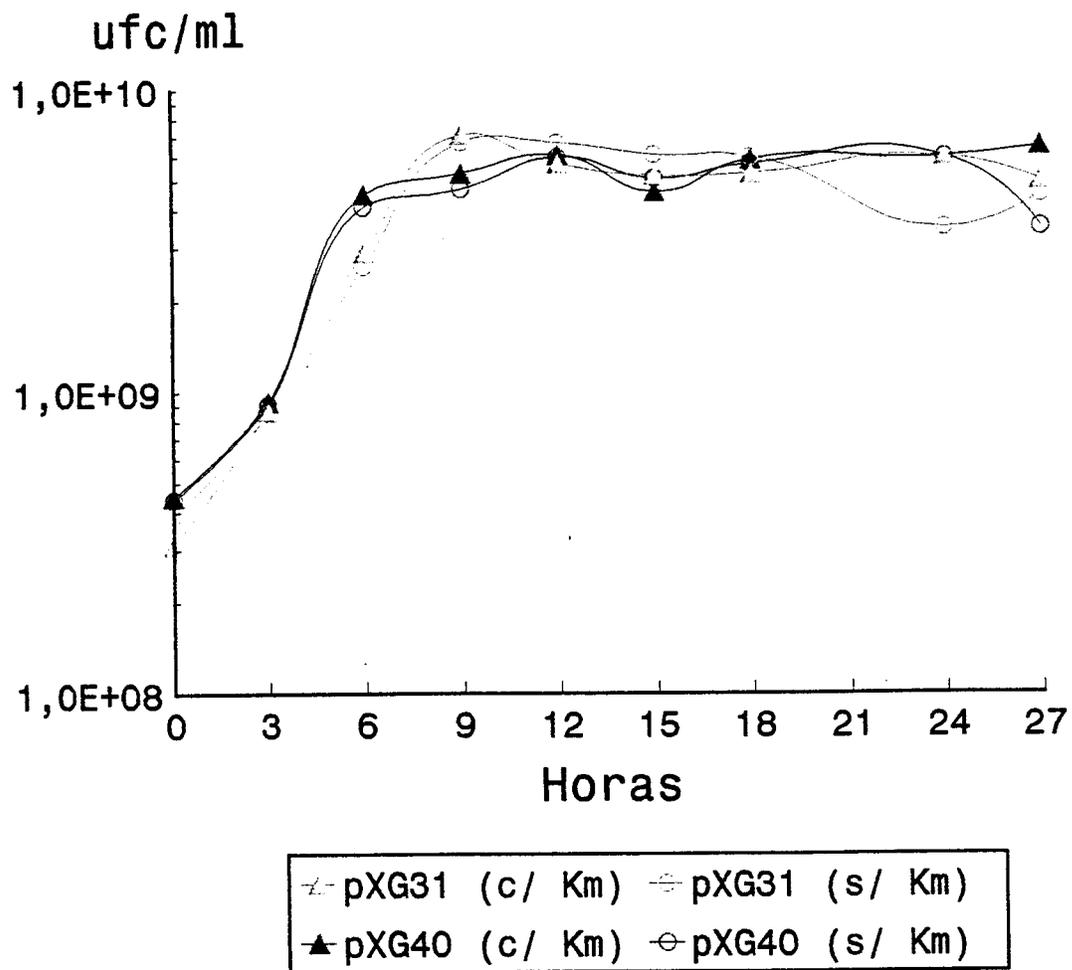


FIGURA 7. Estabilidade dos derivados do p333.1, pXG31 e pXG40, em meio não seletivo, na linhagem 317 de *X. campestris* pv. vesicatoria.

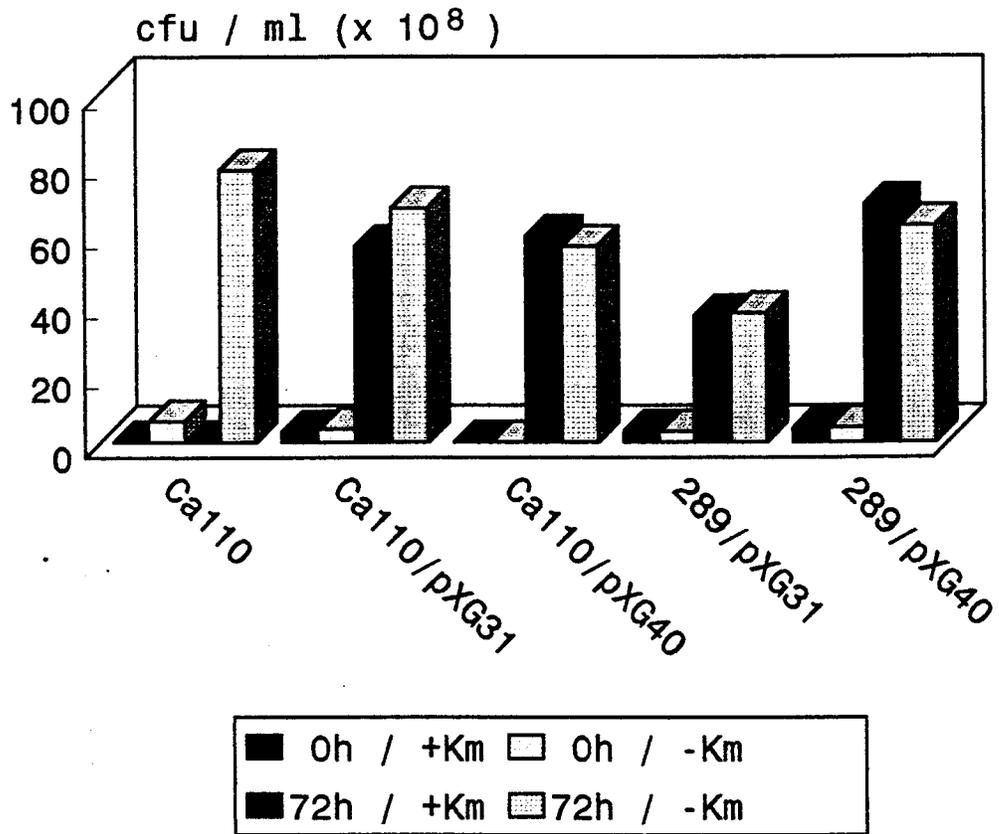


FIGURA 8. Estabilidade dos plasmídios pXG31 e pXG40 nas linhagens Ca110 e 289, após fermentação por 72 horas.

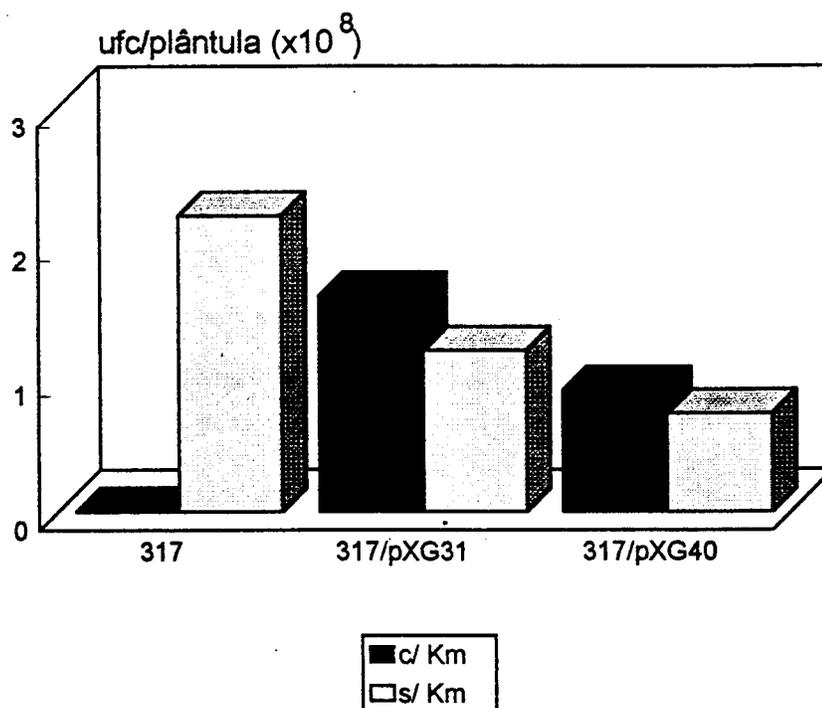


FIGURA 9. Estabilidade dos plasmídios pXG31 e pXG40 na linhagem 317, após 14 dias da inoculação em sementes de tomate.

9. Perfil de proteínas totais de linhagens portadoras do p333.1 ou pXG40.

As proteínas totais das linhagens 333 (selvagem, contém o p333.1), 333 Sp^F (não contém o p333.1), 8460 e 8460 contendo o pXG40 (8460/pXG40) foram extraídas e analisadas por SDS - PAGE. Não foram observadas bandas adicionais nas linhagens que contém o p333.1 ou o pXG40. No caso da 8460/pXG40, nem mesmo a banda correspondente ao produto de gene *aphA* foi detectada. A linhagem 333 Sp^F apresentou uma banda de cerca de 40 kDa (kiloDaltons) a mais que a linhagem selvagem, 333.

10. Efeito dos plasmídios pXG31 e pXG40 na fitopatogenicidade.

10.1. Teste em plantas adultas.

Neste experimento, não houve diferença entre os sintomas nas folhas inoculadas com a linhagem 317 ou suas derivadas contendo o pXG31 e o pXG40. Os pontos de inóculo desenvolveram uma coloração escura e apresentaram o encharcamento, que é o sintoma causado pelo pv. vesicatoria em plantas de tomate (Figura 10A).

A linhagem 333 não é patogênica para tomate e não apresentou modificações nesta característica quando seu plasmídeo nativo, o p333.1, foi substituído por seus derivados contendo o gene de resistência à canamicina e o locus de estabilidade *parB*. Os pontos de inóculo apresentaram características similares às causadas pelo meio NYGB, utilizado como controle negativo (Figura 10B).

A



B



FIGURA 10. Teste de patogenicidade em folhas de tomateiro das linhagens 317 (A) e 333 (B) quando portadoras dos derivados do p333.1 (pXG31 e pXG40).

10.2. Teste em sementes.

Os resultados estão apresentados na Figura 11. Os plasmídios introduzidos nas linhagens 333 e 317 não ocasionaram mudanças no comportamento destas frente à virulência para plântulas de tomate, quando as sementes foram tratadas com suspensões bacterianas.

Os sintomas apresentados pelas plântulas cujas sementes foram tratadas com a linhagem 317 contendo ou não os pXG's variaram de pontos com coloração marron nas folhas até a necrose total, provocando a morte das plântulas. A altura também foi comprometida, já que tais plântulas tiveram uma menor taxa de crescimento (dado não mostrado).

As plântulas inoculadas com a linhagem 333 e suas derivadas apresentaram-se como as do controle negativo (tratamento com água esterilizada). Os únicos sinais foram uma leve clorose nas folhas de algumas plântulas.

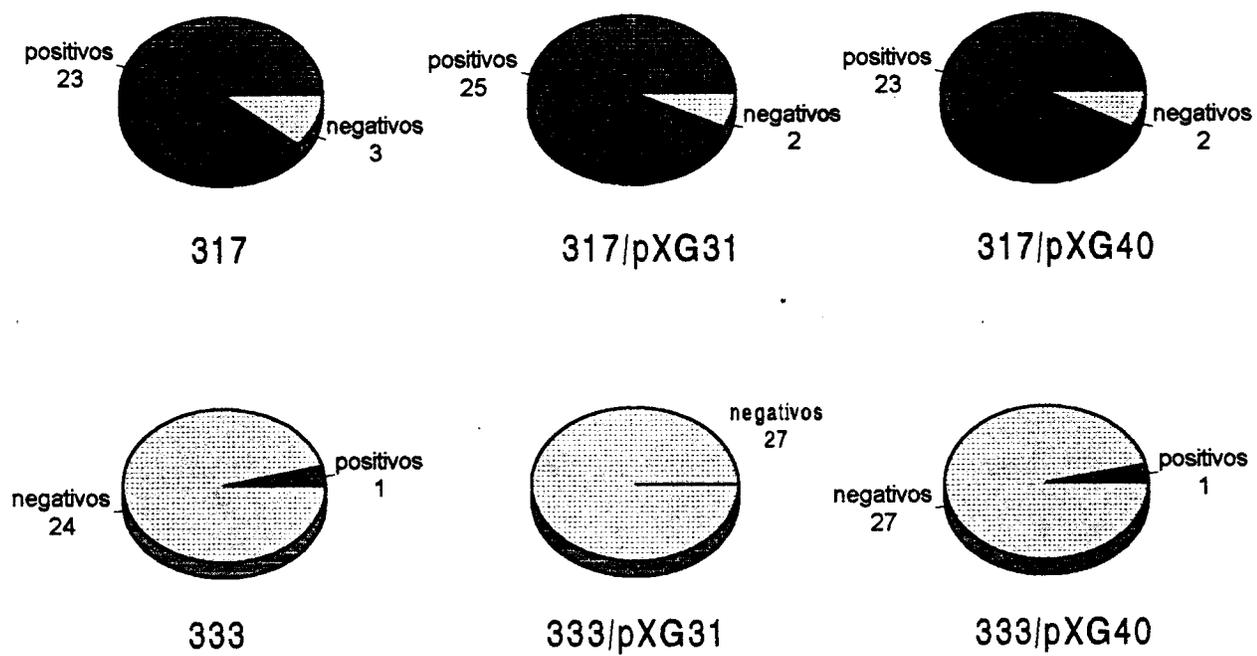


FIGURA 11. Sintomas em plântulas cujas sementes foram tratadas com linhagens contendo os derivados do p333.1.

11. Interferência dos plasmídios pXG31 e pXG40 na produção da goma xantana.

As medidas de viscosidade obtidas demonstram que a produção de goma xantana pela linhagem Ca110 não se altera quando portadora dos plasmídios pXG31 e pXG40, conforme pode ser observado na Tabela 9. As letras ao lado dos números representam valores estatisticamente iguais (letras iguais) ou diferentes; segundo o teste de Tukey a 5% ($F=21,76$).

Tabela 9. Viscosidade dos caldos de fermentação (cps) das linhagens Ca110 selvagem e portadora dos derivados do p333.1.

Linhagem	Viscosidade (cps)		
	20 rpm	50 rpm	100 rpm
Ca110	342,0 a	175,0 b	109,2 b
Ca110/pXG31	329,0 a	198,0 b	130,0 b
Ca110/pXG40	304,0 a	183,0 b	123,0 b

12. Teste de capacidade bacteriocinogênica das linhagens portadoras dos plasmídios pXG31 e pXG40.

Como a linhagem 333 é produtora de bacteriocina, realizou-se um teste para se verificar se os genes responsáveis por esta característica estavam presentes no p333.1, já que o trabalho de Oliveira (1993) sugere uma localização plasmidial destes. Para tanto, as linhagens 289, 333, 317, 479, 8460 e Ca110 selvagens ou portadoras dos plasmídios pXG31 e pXG40 foram testadas contra as linhagens sensíveis 401 e 411. Apenas as linhagens 333, 333/pXG31 e 333/pXG40 causaram a inibição do crescimento das linhagens sensíveis.

13. Sequenciamento do p333.1.

13.1. Deleção unidirecional e sequenciamento do p1.3.

Para se efetuar a deleção unidirecional pelo método de Henikoff (1987), o p1.3 foi digerido com as enzimas *EcoRI* e *KpnI*, estando ambos os sítios no "polylinker" do vetor. O sítio *EcoRI*, mais próximo do inserto, originou uma extremidade 5' protuberante, que foi atacada pelo tratamento com exonuclease III, enquanto que a extremidade originada por *KpnI* era protegida. A enzima S1 nuclease foi utilizada para retirar as fitas simples, originando extremidades abruptas que foram ligadas com T4 DNA ligase. Os sistemas usados para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α . Após análise de cerca de 50 clones obtidos, oito foram escolhidos para o sequenciamento, utilizando-se o "primer" pUC / M13 reverso. Também foram sequenciadas as extremidades do inserto do p1.3, utilizando-se ambos os "primers" (direto e reverso). Os clones cujas sequências foram lidas estão esquematizados na Figura 12. Foi obtida uma sequência de 993 pares de base.

Esta sequência foi enviada ao banco de dados GenBank e não apresentou homologia com nenhuma sequência plasmidial, apenas um trecho de 59 pares de base com 61% de homologia com parte do gene da apolipoproteína A-I de galinha.

Com o auxílio do programa DNAsis, foram detectados sítios para as enzimas de restrição *ApaI*, *BglI*, *DdeI* (1 sítio cada), *HinfI* (4 sítios), *MspI* (5), *HaeIII* e *HhaI* (9 sítios cada).

13.2. Sequenciamento de outros subclones *Sau3AI*.

Foram sequenciadas as duas extremidades dos clones 6, 20 ("primers" direto e reverso); enquanto apenas uma das extremidades dos clones 26 e 23, com o "primer" direto (Figura 12). O clone 6 (fragmento B) teve toda sua sequência determinada e está

contido na extremidade direita do clone 20, que, devido ao maior tamanho do inserto, não pode ser totalmente sequenciado, ou seja, não houve sobreposição das extremidades. Os clones 26 e 23, correspondendo respectivamente aos fragmentos C e D, também foram totalmente sequenciados.

13.3. Deleção unidirecional e sequenciamento do pX310.

Para que os fragmentos *Sau3AI* sequenciados pudessem ser alinhados no sentido correto, e para que cada sequência fosse lida pelo menos em duas reações distintas para evitar dúvidas, procedeu-se à deleção unidirecional do pX310.

Numa primeira etapa, o inserto deste plasmídeo foi sequenciado em suas duas extremidades, com os dois "primers". Foi constatado que o sítio de *HaeIII* no qual se ligou o fragmento marcador *parB aphA* está quase no centro do fragmento A (inserto do p1.3), o qual não perdeu nenhum fragmento *HaeIII*. Para a obtenção dos subclones, o pX310 foi digerido separadamente com as enzimas *ApaI* e *EcoRI* e foi submetido ao tratamento com a exonuclease III a 37°C, sendo retiradas alíquotas em intervalos de tempo de 30 segundos, num total de 25. Após reparo das extremidades e recircularização, 12 destas foram utilizadas para transformar *E. coli* DH5 α . De um total de 47 colônias analisadas, 6 foram sequenciadas. Os fragmentos lidos estão esquematizados na Figura 12.

Com esta nova leitura, pode-se detectar um novo fragmento *Sau3AI* de apenas 68 pares de base (fragmento E) e, finalmente, houve o alinhamento de todas as sequências obtidas até então, obtendo-se a sequência completa do p333.1, de 1741 bp (Figuras 12 e 13) e seu conteúdo de C+G, de 60,3%.

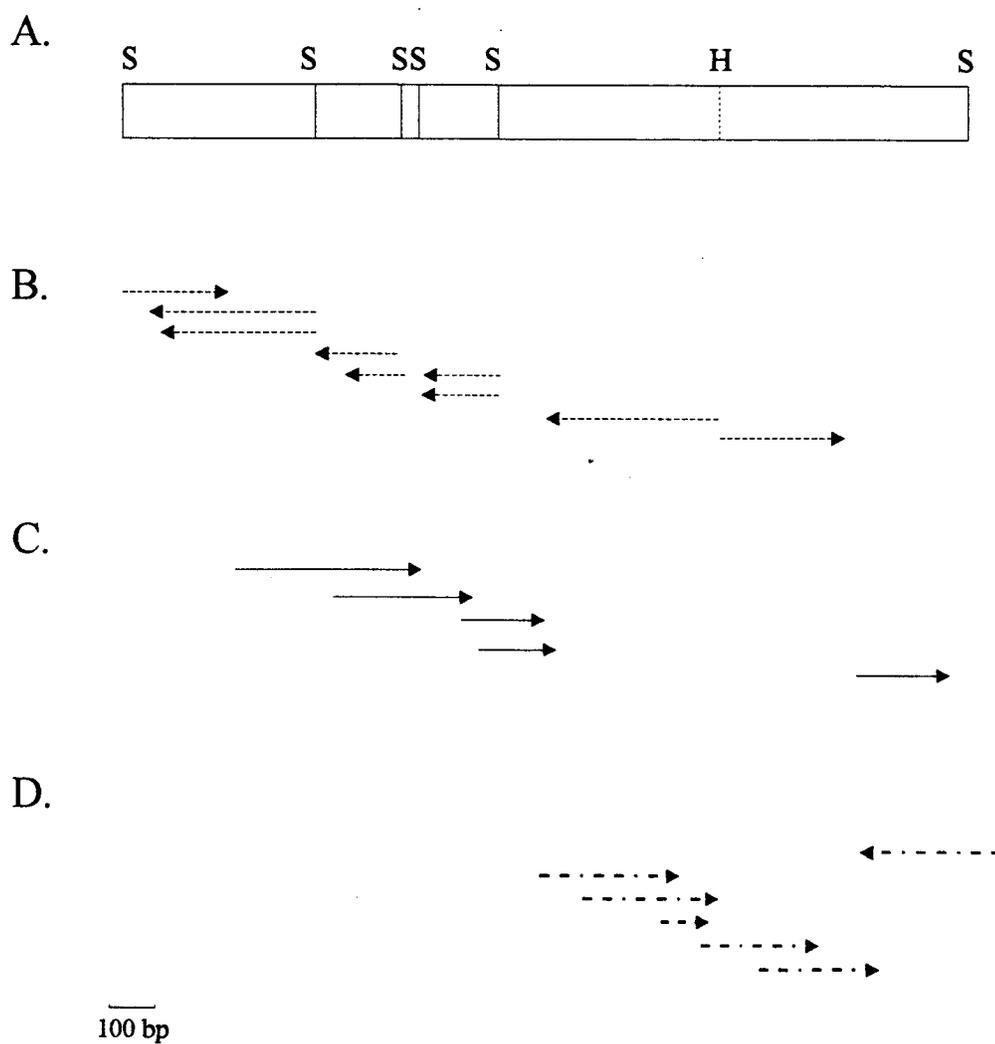


FIGURA 12. Subclones utilizados para o sequenciamento do p333.1. **A.** Mapa do p333.1; **B.** Subclones *Sau3AI*; **C.** Subclones da deleção unidirecional do pX310; **D.** subclones da deleção unidirecional do p1.3. S: sítios *Sau3AI*, H: sítio *HaeIII* no qual foi inserido o fragmento marcador para originar o pX310.

TCTCTTGGCC CTTGCTGTAC AGCTTCAAGG ACCAACGCCG GCTGTTCTTG CCGAAATACA
 GAGTCGAGCC TTTCATCAGT TGCCCCGCCA CGGTTGGCCA GATGGGCAGT CCTGCTCAGC
 GGACGCGAGC CACGCCAGCT ACCTCGCGGC GACTGCGCAG GTGGAAGGAT TCGGTGCAGT
 CAACGCGGGT GAGCCTGATA CGCCCCTCAG CCCATGCAGC CCTGTCTTCA TCGGTAGGCG
 TCAAACCAAG CTGCTCGACC AGCGCTTCAA TCGTGGCAAC AGCCAGACCG TGAAGGTCAT
 CCGTACCCCA AAGGTTGTGG CCTTGGAAAC ATTTAGCCGG GTTGCCATCA ATCCAAAGAT
 GCGTGCAGGG ATCTGGGCTT TCATGGGCAG CAGTTGCCAC ACCAATACTG CCGCCAAAGC
 TGCCTTCAAC CCTTCGTTTC TTCTTGGACT CCCAAGAAAG CTCACCATTG GCGTCCACAC
 ATAGAACCTT CCCACCATCT ATGGGGGTCT GGTGCTTGCA AGGAACCACC ATCGTGAGCC
 AGTCGATCAT CAGGTCGGCG CCGTTCCTCA TCGCTGCACG GCGCTTGGTC TTCATTTCCA
 GCTGAGCGTG ATCGGCGGCT GATGAAGCCT CGCGGAGAAC ATCTCCCATG ACCTTGAGGC
 GTCCACGTTT TTGTTGTGGG CCATCTCAGC AGGCGCGGGC AATCTCGGCG AACATCGGAT
 AACCCTCAAT CAACCATTAA CGGATGATCG AGGACATCGA CCACTTCGGG GGCAGAGGC
 AGATTCACGC GGGTAAGTTT GCTGGGCATG GCGGAGCGTA CTAGGTGTAA CACAAGGGCG
 CAATAGCGGG TTGGTTTGTG CATGGCGTGC ACAAATGTGCG GTATCTCTGA GGGGGGTGTC
 GGTCTATGCC GTAGACAAAT GTGCGGTATC ACTAGCCCCG CACATCCCCT CCAGGCGGTC
 GGCAGCCGAA ACGAGGTCGG CGTCTCACTC CTCCTGCACA CCGCCACAGC CCCGCGCAA
 GCGTCACCGG GCGCGGGGGA GGTGGACGCA GGGGGAGGCT GATGGCCGCG CATGGGCACC
 ACAGGCCACT CACTTACCGG TGAAGAGCGG TCACCGTGGG GCCACGCCAA CCCCTAGGCA
 TTGTGTAAAC ACGTTGGCGG CGGCGGCCTA TCCTGCAATA GGCAACCTTT CTTGGCGTGC
 CAAAGAAAA ACCCTCCGGG GTGGCGTTCT TTCTTACCC AACGTACGCG GAGTCGTCGT
 GGTTCGTAAT ACAGGTTTCGT CCTACAGCCC AATCGGGGAT TGCCGCAGAC CGCTTCAAGG
 GTCTTGAACA GCGGCACCAC GTTGGAGACT TCCTTGGGAC GACCGTAGCA ATGTCGATTG
 ACGTGCATCC AGAAGTCTTG AACTTGTAGA AAGTCGCTTA GCGGCGATGG CGCGTAGTTC
 AGAGCCAGAT TCCCAAGACT GGTAGGCCAT GCGCGAAAGC CGGACGCATG CTGTCCAGGA
 CATCGGCCAG GCAGGTTGGC TGTGGTGGTC ATGGTCATGC CTTGAGACG GCTTCGGAGT
 AACTCCAGAG TAACACCCTC CCCCAGAGAG TCCTTGTCAG ACCACTGGCC AACATAGGCG
 AGGTTCAAGC GTTGCAGCTC CATCCCGCGC AGGTCAGCT CAGCCCGTAG CGTCTTGTCA
 GCCCATTCAA CGGCATGGGG TAGGGCAAGA ACGGCGTCTT GCCCGTGGCC CTTGGCGCGG

A

FIGURA 13. Sequência de nucleotídeos do p333.1.

13.4. Regiões abertas de leitura (ORF's) no p333.1.

Através do programa DNAsis, foram detectadas 29 prováveis regiões abertas de leitura (ORF's, do inglês "open reading frames") com o códon de iniciação ATG, sendo 10 delas na fita convencionada como direta e 19 na fita complementar à esta (Tabela 10). O programa utilizado baseia-se na metodologia de Fickett *et al.* (1992) para predizer se uma determinada região compreendida entre um códon de iniciação e um de terminação é codante ou não para uma proteína, através da análise das propriedades estatísticas desta região. Neste trabalho, foram desconsideradas as ORF's que se apresentaram por este método como não-codante ou aquelas às quais o programa se diz "incapaz de identificar".

Porém, não foi possível determinar se tais regiões são transcritas, já que inexistem sítios -10 e -35 semelhantes aos consensos de *E. coli*.

Tabela 10. Prováveis regiões abertas de leitura (ORF's) do p333.1.

ORF	início(*) (ATG)	término (TGA ou TAA+)	bp	PM (Da) da possível proteína	fita D: direta C: complementar	fase de leitura
1	808	846	39	1436,57	D	1
2	862	1062	201	6557,15	D	1
3	919	1062	144	4623,98	D	1
4	1531	1617	86	3181,42	D	1
5	1537	1617	81	2951,10	D	2
6	359	484	126	4374,91	D	2
7	383	484	102	3441,83	D	2
8	501	605	105	3722,25	D	3
9	1371	1409	39	1366,53	D	3
10	1488	(+)1562	75	2489,61	D	3
11	46	87	42	1477,67	C	1
12	985	(+) 1002	18	705,83	C	1
13	1027	1056	30	1011,17	C	1
14	1093	1626	534	19434,97	C	1
15	1146	1626	481	17553,05	C	1
16	1171	1626	456	16609,92	C	1
17	1210	1626	417	15092,33	C	1
18	272	427	156	5535,84	C	2
19	1058	1150	93	3538,84	C	2
20	1100	1150	51	1912,18	C	2
21	1244	1501	258	9596,05	C	2
22	1274	1501	228	8358,62	C	2
23	1358	1501	144	5339,16	C	2
24	1394	1501	108	4012,57	C	2
25	1442	1501	60	2320,69	C	2
26	669	1016	348	12658,24	C	3
27	879	1016	138	5102,90	C	3
28	933	1016	84	3025,46	C	3
29	1260	1280	21	779,91	C	3

(*) A posição da primeira base é em relação à extremidade da fita 5' em questão, ou seja a base 1 da sequência complementar corresponde à base 1741 da fita direta.

14. Construção de um plasmídio bifuncional *X. campestris* - *E. coli*.

Com o objetivo de se obter um plasmídio que fosse funcional tanto em *X. campestris* quanto em *E. coli*, foi construído inicialmente o plasmídio pX403. Para tanto, tomou-se como base o plasmídio pXG40, a fim de se inserir um fragmento contendo a origem de replicação do pBluescript II KS+. As etapas de construção estão esquematizadas na Figura 14 e os plasmídios construídos estão descritos na Tabela 6.

Inicialmente, o pXG40 foi digerido com *Bam*HI e ligado ao fragmento *Sau*3AI do pBluescript II KS+ de 1031 bp, onde está localizada sua origem de replicação plasmidial. Após transformação de *E. coli* e análise dos clones, foram obtidos os plasmídios pX401 e pX402, sendo a diferença entre eles apenas a orientação do fragmento do pBluescript II KS+ em relação ao pXG40. Foi dada continuidade ao trabalho com o pX402. Um dos sítios *Bam*HI foi refeito, pois era resultado da ligação da extremidade do fragmento de 1031 bp que continha o sítio *Bam*HI do "polylinker". O pX402 apresentou dois sítios *Pvu*II, um em cada fragmento *Sau*3AI, e cerca de 3,8 kb.

Foi então realizada uma digestão total do pX402 com *Bam*HI, reparo das extremidades com Klenow + dNTP's e, após a retirada das enzimas, uma digestão parcial com *Pvu*II. A amostra foi submetida a uma eletroforese em gel de agarose, a banda de cerca de 3,5 kb foi retirada e o DNA teve suas extremidades religadas. Este procedimento teve por objetivo deletar um região de 288 bp do fragmento proveniente do pBluescript KS+ que continha parte de seu "polylinker" (de *Bam*HI até *Kpn*I, ver Figura 1).

A ligação foi utilizada para se transformar *E. coli* e os clones obtidos tiveram seu DNA extraído e analisado por digestão com *Eco*RI e eletroforese em gel de agarose. Foi selecionado um clone, que apresentou plasmídio com o tamanho esperado (~3,5 kb) e apenas um sítio *Eco*RI, denominado pX403. Este plasmídio apresenta origens de replicação funcionais em *X. campestris* e *E. coli*, resistência à canamicina e sítios únicos de restrição para as enzimas *Bam*HI, *Eco*RI, *Kpn*I e *Sal*I, que não interrompem regiões

essenciais para a replicação ou expressão da marca de resistência à canamicina (Figura 14).

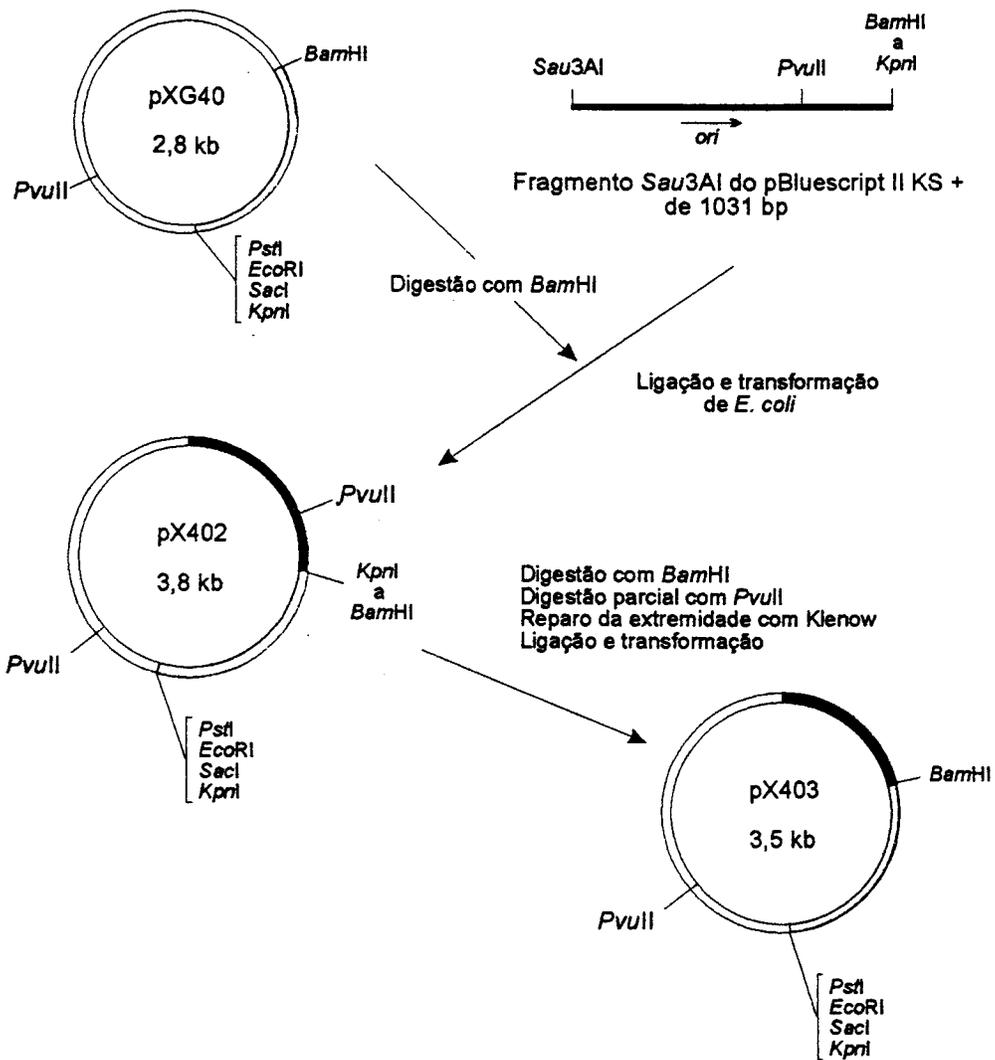


FIGURA 14. Etapas da construção do plasmídio bifuncional pX403.

DISCUSSÃO

Através deste trabalho, caracterizou-se um plasmídio nativo de *X. campestris* pv. *glycines* 333. Este plasmídio, denominado p333.1, é estável, multicópia, não conjugativo e se mantém em linhagens de *X. campestris* de diferentes patovares. Não apresentou homologia com plasmídios de outras linhagens, tais como 289, 479 e 223 (pv. *citri*; dados não mostrados), ou com DNA cromossômico.

O p333.1 mostrou-se específico de *X. campestris*, sendo que não se mantém em *E. coli* e não apresenta homologia com plasmídios de 11 grupos de incompatibilidade diferentes desta bactéria, com o banco de grupos de incompatibilidade (Couturier *et al.*, 1988) ou com sequências depositadas no GenBank. Além disso, não pôde ser transferido com sucesso para *Pseudomonas syringae* 604 (dado não mostrado). Neste último caso, o experimento de eletrotransformação foi realizado com parâmetros ótimos para *X. campestris*, sendo que estes podem não ser ideais para *Pseudomonas*, apesar dos gêneros serem relacionados.

Os derivados do p333.1 não apresentaram incompatibilidade com plasmídios nativos de *X. campestris* 289, 479 e com o plasmídio de alto peso molecular da 333. Isto pode sugerir que os plasmídios nativos de *X. campestris* possuem diferentes estratégias de replicação. Um plasmídio da linhagem 223 de *X. campestris* pv. *citri* é capaz de se manter em *E. coli*, apresentando uma região de cerca de 7 kb suficiente para esta função (Baldini & Rosato, 1992 e 1993). Chang *et al.* (1991) também relataram que uma região de 14kb do pXW45N de *X. campestris* pv. *citri* pode se replicar em *E. coli*.

A análise da sequência do p333.1 não demonstrou características relacionadas na literatura com origens de replicação plasmidiais. Não foram encontradas sequências repetidas invertidas ou diretas próximas de regiões ricas em A+T, sítios de ligação da proteína DnaA ou de alguns fatores de replicação do hospedeiro (Scott, 1984; Kües & Stahl, 1989). A região responsável pela auto-replicação do p333.1 parece abranger grande

parte de sua sequência, uma vez que as tentativas de se ligar um marcador a fragmentos menores ou de se reintroduzir os subclones de deleção na linhagem 333 falharam.

O fato de não se conseguir clones em experimentos em que o p333.1 foi digerido parcialmente com a enzima *Sau3AI* sugere que estes sítios podem estar envolvidos com a replicação. Em *E. coli*, há "repeats" contendo o motivo GATC na origem de replicação cromossômica, *oriC* (Marians, 1992). Nem mesmo o clone 13, que contém todo o p333.1, não se mantém em *X. campestris*, o que poderia justificar esta hipótese. Por outro lado, apesar de conter todos os fragmentos do p333.1, estes podem não estar na ordem ou orientação correta. Este problema poderia ser resolvido com o sequenciamento deste clone.

A função do p333.1 na célula também não pôde ser observada. A análise do perfil proteico por SDS - PAGE não trouxe dados sobre este aspecto, já que nenhuma proteína codificada pelo p333.1 ou pXG40 foi detectada. Porém, a resolução do gel ou o método de extração podem não ter sido ideais, sendo que o produto de gene *aphA*, a neomicina transferase, presente no pXG40, também não foi detectado.

Uma característica fenotípica marcante da linhagem 333 é a produção de bacteriocina com atividade contra determinadas linhagens do pv. vesicatoria (Oliveira, 1993). Para se verificar se o p333.1 tinha algum papel na capacidade bacteriocinogênica, as linhagens de *X. campestris* contendo seus derivados foram testadas frente às linhagens sensíveis 401 e 411. O resultado foi negativo, indicando que o(s) gene(s) responsáveis por esta atividade não se encontra(m) no p333.1. Neste caso, pôde ser descartada a hipótese que o gene estaria interrompido pelo inserção do marcador no sítio *HaeIII*, já que a linhagem 333 contendo o pXG31 e o pXG40 continua sendo bacteriocinogênica.

Como a finalidade deste trabalho era a caracterização de um plasmídio que servirá de base para a construção de um vetor de clonagem, ele não poderia conter sequências que interferissem nas características que são estudadas, ou seja, na fitopatogenicidade e produção de goma xantana. Foram então delineados experimentos onde se demonstrou

que os derivados do p333.1 não alteram as propriedades de linhagens patogênicas ou produtoras de goma. Além disso, o pXG40 se mantém estável nas condições experimentais em que se analisam o papel de genes potencialmente envolvidos nestas características.

Uma das limitações do p333.1 é a sua não manutenção em *E. coli*, o que foi resolvido com a introdução de um replicon do grupo ColE1 no pXG40, originando o pX402 e o pX403.

As ORF's encontradas não apresentaram sequências -10, -35 ou de Shine-Dalgarno próximas aos consensos de *E. coli*. A maioria delas é pequena (12 têm menos de 100 pb) e a maior possui 534 pb, com o provável produto com cerca de 19 kDa, que não foi detectado em gel de poliacrilamida. Se este for um produto essencial para a replicação, ele possivelmente ocorre em baixas concentrações, não sendo detectado pela sensibilidade da metodologia empregada. A sequência também foi comparada com promotores de *X. campestris* (Dums *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1991; Parker *et al.*, 1993; Hu *et al.*, 1992) descritos na literatura, sem que se encontrasse homologia.

Como conclusão do trabalho, a partir dos dados obtidos dos experimentos realizados, tem-se que o plasmídio estudado provavelmente pertence a um novo grupo e que apresenta características desejáveis para ser utilizado como base para a construção de um vetor de clonagem multicópia, estável e específico para *Xanthomonas campestris*, sem interferir na patogenicidade ou produção de exopolissacarídeo. Um sítio de policlonagem no interior de um gene marcador poderão completar o vetor bifuncional, que será baseado no pX403.

SUMMARY

Xanthomonas campestris is a bacterium which has been studied concerning phytopathogenicity and xanthan gum production. Although many studies using molecular biology techniques have been carried out in *X. campestris*, it lacks a specific, multicopy, and stable cloning vector. In order to develop a new vector, this work has characterized a miniplasmid, p333.1, from *X. campestris* pv. *glycines* 333. This plasmid has shown restriction sites for *Sau3AI*, *PvuII* and *HaeIII* and was not clived by *AccI*, *AvaI*, *BamHI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HincII*, *HindIII*, *PstI*, *KpnI*, *SacI*, *SmaI*, *SphI*, *XbaI* e *XhoI*. It has presented approximately 20 copies per cell and no protein codified by p333.1 could be detected using a polyacrilamide gel electrophoresis.

By digesting p333.1 partially with *HaeIII* and ligating it to a fragment containing a stabilization locus (*parB*) and a kanamycin-resistance gene, pXG31 has been constructed. It could be maintained in *X. campestris*, but not in *E. coli*. A derivative, pXG40, has been constructed without the stabilization locus. Both pXG31 and pXG40 were stable during growth in non-selective media for 27 hours, in pathogenicity tests in tomato seedlings for 15 days or during 72-hours fermentation. They have not altered the pathogenicity of strains 317 and 333 to tomato seedlings or mature plants, nor the xanthan gum production by strains 289 and Ca110.

The bacteriocin production of the original host strain of p333.1 has not been related to p333.1. This plasmid was not mobilizable to other strains of *X. campestris*.

pXG31 and pXG40 have been succesfully transferred by electroporation to strains of pathovars *campestris*, *manihotis*, *vesicatoria* and *glycines*, and were compatible with the native plasmids of these strains. p333.1 did not hibridize with plasmids of strains 289 and 479, with chomosomal DNA of *X. campestris*, or with plasmid from 22 *E. coli* incompatibility groups .

Attempts to subcloning the replication region of p333.1 using *Sau3AI* were unsuccessful. This may indicate that a extensive region of the plasmid is involved with its own maintenance, or that the *Sau3AI* sites interrupt this region.

The whole p333.1 has been subcloned in the vector pBluescript II KS + and sequenced. It has not been found regions with replication motifs, promoter consensus sequences of *E. coli* or *X. campestris*, or homologous sequences in GenBank. p333.1 presented 1741 bp and a G+C content of 60.3%.

In order to allow a further construction of a shuttle vector, a fragment containing the replication origin of the vector pBluescript II KS+ (ColE1) has been introduced in pXG40, originating two plasmids, pX402 and pX403. The latter has presented unique sites for *Bam*HI, *Eco*RI, *Kpn*I and *Sac*I, which may be useful for cloning experiments.

Concluding, p333.1 is a stable, multicopy, and non-conjugative cryptic plasmid, which does not interfere in pathogenicity and xantan gum production. These features are desirable for a new cloning vector. It may represent a new group of phytopathogenic bacteria plasmids.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. 1989. *Plant Pathology*. Third edition, Academic Press, Inc., San Diego, California.
- ARLAT, M.; GOUGH, C.L.; BARBER, C.E.; BOUCHER, C. & DANIELS, M.J. 1991. *Xanthomonas campestris* contains a cluster of *hrp* genes related to the larger *hrp* cluster of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 4: 593-601.
- ATKINS, D.T.; BARBER, C.F. & DANIELS, M.J. 1987. Transformation of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* with plasmid DNA. *J. of Gen. Microbiol.*, 133: 2727-2731.
- BAGDASARIAN, M.; LURZ, R; RUKERT, B; FRANKLIN, F.C.H.; BAGDASARIAN, M.M.; FREY, J. & TIMMIS, K.N. 1981. Specific-purpose plasmid cloning vectors. II: Broad host range, high copy number RSF1010-derived vectors and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene*, 16: 237-247.
- BAIRD, J.K; SANDFORD, P.A. & COTTRELL, I.W. 1983. Industrial applications of some new microbial polysaccharides. *Biotechnol.*, 1 : 778-783.
- BALDINI, R.L. & ROSATO, Y.B. 1992. *Isolamento de uma origem de replicação plasmidial de Xanthomonas campestris pv. citri*. Trabalho apresentado em forma de painel na 18ª Reunião Anual de Genética de Microrganismos, São Paulo, S.P.
- BALDINI, R.L. & ROSATO, Y.B. 1993. *Um replicon plasmidial de Xanthomonas campestris pv. citri para o desenvolvimento de vetores de clonagem*. Trabalho apresentado em forma de painel no 39º Congresso Nacional de Genética, Caxambu, M.G..
- BARRÈRE, G.C., C.E. BARBER & DANIELS, MJ. 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.

- BEAULIEU, C.; MINSAVAGE, G.V.; CANTEROS, B.I & STALL, R.E. 1991. Biochemical and genetic analysis of a pectate lyase gene from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 4: 446-451.
- BENDER, C.L.; MALVICK, D.K.; CONWAY, K.E.; GEORGE, S & PRATT, P. 1990. Characterization of pXV10A, a copper resistance plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 170-175.
- BERGER, S.L. & KIMMEL, A.R. 1987. *Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques*. Academic Press, Inc., San Diego, California.
- BIRBOIM, H.C. & DOLY, J.A. 1979. A rapid alkaline extraction procedure to screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7: 1513-1523.
- BOLIVAR, F. & BACKMAN, K. 1979. Plasmids of *Escherichia Coli* as cloning vectors. *Methods Enzymol.*, 68: 245.
- BONAS, U.; SCHULTE, R.; FENSELAU, S.; MINSAVAGE, G.V.; STASKAWICZ, B.J. & STALL, R.E. 1991. Isolation of a gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1: 81-88.
- BONAS, U.; STALL, R.E. & STASKAWICZ, B. 1989. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Gen. Genet.*, 218: 127-136.
- BLUM, H.; BEIER, H. & GROSS, H.J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis*, 8: 93-99.
- CANTEROS, B.; MINSAVAGE, G.; BONAS, U.; PRING, D. & STALL, R. 1991. A gene from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines avirulence in tomato is related to *avrBs3*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 4: 628-632.
- CHANG, B.; CHOU, H. & TU, J. 1991. *Xanthomonas* plasmid pXW45N replicates in *Escherichia coli*. *Bot. Bull. Academia Sinica*, 32: 139-143.

- CIVEROLO, E.L. 1985. Indigenous plasmids of *X. campestris* pv. citri. *Phytopathol.*, 75: 524-528.
- CLOSE, T.J.; ZAITLIN, D.S. & KADO, C.I. 1984. Design and development of amplifiable broad-host-range cloning vectors: analysis of the *vir* region of *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiC58. *Plasmid*, 12:111-118.
- COPLIN, D.L. & COOK, D. 1990. Molecular genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 5: 271--279.
- COUGH, C.G.; DOW, J.M.; BARBER, C.E. & DANIELS, M.J. 1988. Cloning of two endoglucanase genes of *Xanthomonas campestris* pv. campestris: Analysis of the role of the major endoglucanase in pathogenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1: 275-281.
- COUTURIER, M.; BEX, F.; BERGQUIST, P.L. & MAAS, W.K. 1988. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol. Rev.*, 52: 375 - 395.
- DANIELS, M.J.; BARBER, C.E.; TURNER, P.C.; SAWCZYC, M.K.; BYRDE, R.J.W. & FIELDING, A.H. 1984. Cloning of genes involved in pathogenicity of *xanthomonas campestris* pv. campestris using the broad host range cosmid pLAFR1. *The EMBO J.*, 3: 3323-3328.
- DATTA N, HEDGES RW, SHAW EJ, SYKES RB AND RICHMOND MH (1971) Properties of an R factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 108: 1244-1249.
- DANIELS, M.J.; BARBER, C.E.; TURNER, P.C.; SAWCZYC, M.K.; BYRDE, R.J.M. & FIELDING, A.H. 1984. Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. campestris using the broad host range cosmid pLAFR1. *The EMBO J.*, 3: 3323-3328.
- DAY, M. 1987. The biology of plasmids. *Sci. Prog., Ox.*, 71: 203-220.

- DeFEYTER, R.; KADO, C.I. & GABRIEL, D.W. 1990. Small, stable shuttle vectors for use in *Xanthomonas*. *Gene*, 88: 65-72.
- DeFEYTER, R. & GABRIEL, D. W. 1991a. At least six avirulence genes are clustered on a 90-kilobase plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 4: 423-432.
- DeFEYTER, R. & GABRIEL, D.W. 1991b. Use of cloned methylase genes to increase the frequency of transfer of foreign genes into *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *J. Bacteriol.*, 173: 6421-6427.
- DESTEFANO, S.A.L. 1994. *Isolamento e análise do clone pMV08 envolvido com a biossíntese do exopolissacarídeo de Xanthomonas campestris*. Tese de Doutorado, I.B., UNICAMP.
- DESTEFANO, S.A.L. & ROSATO, Y.B. 1991. Effect of transposon Tn5 on exopolysaccharide production by *Xanthomonas campestris*. *Rev. Brasil. Genet.*, 14: 599-607.
- DITTA, G.; SCHMIDHAUSER, T.; YAKOBSON; E, LU, P; LIANG, W.; FINLAY, D.R.; GUINEY, D & HELINSKY, D.R. 1985. Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid*, 13: 149-153.
- DITTA, G.; STANFIELD, S.; CORBIN, D. & HELINSKY, D.R. 1980. Broad host range cloning system for Gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77: 7347-7351.
- DITTAPONGPITCH, V. & RITCHIE, D.F. 1993. Indigenous miniplasmids in strain of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathol.*, 83: 959-964.
- DOW, J.M.; FAN, M.J.; NEWMAN, M.-A. & DANIELS, M.J. 1993. Differential expression of conserved protease genes in crucifer-attacking pathovars of *Xanthomonas campestris*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 3996-4003.

- DOW, J.M; MILLIGAN, D.E; JAMIESON, L., BARBER, C & DANIELS, M.J. 1989. Molecular cloning of a polygalacturonate lyase gene from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and role of the gene product in pathogenicity. *Physiol Mol. Plant Pathol.*, 35: 113-120.
- DOW, J.M; SCOFIELD, G.; TRAFFORD, K.; TURNER, P.C. & DANIELS, M.J. 1987. A gene cluster in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* required for the pathogenicity controls the excretion of polygalacturonate lyase and other enzymes. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 31: 261-271.
- DUMS, F.; DOW, J.M. & DANIELS, M.J. 1991. Structural characterization of protein secretion genes of the bacterial phytopathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*: relatedness to secretion systems of other gram-negative bacteria. *mol. Gen. Genet.*, 229; 357-364.
- FERREIRA, H., BARRIENTOS, F. J. A., BALDINI, R. L. & ROSATO, Y. B. Electrotransformation in three pathovars of *Xanthomonas campestris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, in press.
- FICKETT, J. W. 1982. Recognition of protein coding regions in DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 10: 5305 - 5319.
- FIGURSKY, D.H. & HELINSKY, D.R. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *in trans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76: 1648-1652.
- FRIEDMAN, A.M.; LONG, S.R.; BROWN, S.E.; BUIKEMA, W.J. & AUSUBEL, F.M. 1982. Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. *Gene*, 18: 289-296.
- FUKUDA, M. & YANO, K. 1985. Construction of broad-host-range vectors for Gram-negative bacteria. *Agric. Biol. Chem.*, 49: 2719-2724.

- GABRIEL, D.W.; BURGESS, A. & LAZO, G.R. 1986. Gene-for-gene interactions of five cloned avirulence genes from *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* with specific resistance genes in cotton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83: 6415-6419.
- GABRIEL, D.W.; KINGSLEY, M.T.; HUNTER, J.E. & GOTTEALD, T. 1989. Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) to species and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.*: 14-22.
- GERDES, K. 1988. The *parB* locus of plasmid R1: a general purpose plasmid stabilization system. *Biotechnology*, 6: 1402-1405.
- GOUGH, C.L.; DOW, J.M.; BARBER, C.E. & DANIELS, M.J. 1988. Cloning of two endoglucanase genes of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: analysis of the role of the major endoglucanase in pathogenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1: 275-281.
- HANAHAH, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166: 557.
- HARDING, N.E.; CLEARY, D.K.; ROSEN, I.G. & KANG, K.S. 1987. Genetical and physical analyses of a cluster of genes essential for xanthan gum biosynthesis in *Xanthomonas campestris*. *J. Bacteriol.*, 169: 2854-2861.
- HAYNES, W.C.; WICKERHAM, L.J. & HESSELTINE, C.W. 1955. Maintenance of cultures of industrially important microorganisms. *Appl. Microbiol.*, 3: 361-368.
- HENIKOFF, S. 1987. Unidirectional digestion with exonuclease III in DNA sequence analysis. *Methods in Enzymology*, 155: 156-165, 1987.
- HOTTE, B.; RATH-ARNOLD, I.; PÜHLER, A. & SIMON, R. 1990. Cloning and analysis of a 35-kilobase DNA region involved in exopolysaccharide production by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J. Bacteriol.*, 169: 2804-2807.

- HU, N.; HUNG, M.; CHIOU, S.; TANG, F.; CHIANG, D.; HUANG, H. & WU, C. 1992. Cloning and characterization of a gene required for the secretion of extracellular enzymes across the outer membrane by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J. Bacteriol.*, 174: 2679-2687.
- HWANG, I.; LIM, S.M. & SHAW, P.D. 1992. Cloning and characterization of pathogenicity genes of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*. *J. Bacteriol.*, 174: 1923-1931.
- JEANES, A., PITTSLEY, J.E. & SENTI, F.R.J. 1961. Polysaccharide B-1459: a new hydrocolloid polyelectrolyte produced by bacterial fermentation. *J. Appl. Polym. Sci.*, 5: 519-520.
- JONES, J.B.; MINSAVAGE, G.V.; STALL, R.E., KELLY, R.O. & BOUZAR, H. 1993. Genetic analysis of a DNA region involved in expression of two epitopes associated with lipopolysaccharide in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology*, 83: 551-556.
- KADO, C.I. & LIU, S. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large plasmids of *Xanthomonas citri* (Hesse) Dowson. *J. Bacteriol.*, 145: 1365-1373.
- KAMOUN, S. & KADO, C.I. 1990. A plant inducible gene of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* encodes an extracellular component required for growth in the host and hypersensitivity in nonhosts. *J. Bacteriol.*, 172: 5165-5372.
- KAMOUN, S.; KAMDAR, H.V.; TOLA, E. & KADO, C.I. 1992. Incompatible interactions between crucifers and *Xanthomonas campestris* involve a vascular hypersensitive response: role of the *hrpX* locus. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 5 : 22-33.
- KEARNEY, B.; RONALD, P.C.; DHABECK, D. & STASKAWICZ, B.J. 1988. Molecular basis for evasion of plant host defence in bacterial spot disease of pepper. *Nature*, 332: 541-543.

- KELENU, S. & LEACH, J.E. 1990. Cloning and characterization of an avirulence gene from *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 3: 59-65.
- KÜES, U. & STAHL, U. 1989. Replication of plasmids in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.*, 53: 491-516.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 676 - 685.
- LAI, M.; PANOPOULOS, N.J. & SHAFFER, S. 1977. Transmission of R plasmids among *Xanthomonas* spp. and other plant pathogenic bacteria. *Phytopathol.*, 67: 1044-1050.
- LEONG, S.A.; DITTA, G.S. & HELINSKY, D.R. 1982. Heme biosynthesis in *Rhizobium*: identification of a cloned gene coding for g-amino levulinic acid from *Rhizobium meliloti*. *J. Biol. Chem.*, 257: 8724-8730.
- LIN, B.; DAY, H.; CHAN, S. & CHIEN, M. 1979. Isolation and characterization of plasmids in *Xanthomonas manihotis*. *Bott. Bull. Acad. Sinica*, 20: 150-171.
- LIU, Y.; TANG, J.; CLARKE, B.R.; DOW, M. & DANIELS, M.J. 1990. A multipurpose broad host range cloning vector and its use to characterise an extracellular protease gene of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Mol. Gen. Genet.*, 220: 433-440.
- MARIANS, K.J. 1992. Prokaryotic DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.*, 61: 673-719.
- MARQUES, L.L.R. 1993. *Isolamento de genes envolvidos na patogenicidade de Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Dissertação de Mestrado, I. B., UNICAMP
- MANDEL., M. & HIGA, A. 1970. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.*, 53: 159.
- MILLER, J.H. 1972. *Experiments in Molecular Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory, cold Spring Harbor, New York.

- MINSAVAGE, G.V.; CANTEROS, B.I. & STALL, R.E. 1990a. Plasmid-mediated resistance to streptomycin in *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. *Phytopathol.*, 80: 719-723.
- MINSAVAGE, G.V.; DAHLBECK, D.; WHALEN, M.C.; KEARNEY, B.; BONAS, U.; STASKAWICZ, B.J. & STALL, R.E. 1990b. Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria-pepper interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 3: 41-47.
- MUROOKA, Y.; IWAMOTO, H.; HAMAMOTO, A. & YAMAUCHI, T. 1987. Efficient transformation of phytopathogenic strains of *Xanthomonas* species. *J. Bacteriol.*, 169: 4406-4409.
- NISHIMURA, A.; MORITA, M.; NISHIMURA, Y. & SUGINO, Y. 1990. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acid Research*, 18: 6169.
- OLIVEIRA, V.M. 1993. *Produção de bacteriocina por Xanthomonas campestris pv. glycines : detecção, caracterização e potencial para a proteção de plantas.* Dissertação de Mestrado, I.B., UNICAMP.
- HAYNES, W.C.; WICKERHAM, L.J. & HESSELTINE, C.W. 1955. Maintenance of cultures of industrially important microorganisms. *Appl. Microbiol.*, 3: 361-368.
- OUSBOURN, A.E.; BARBER, C.E. & DANIELS, M.J. 1987. Identification of plant-induced-genes of the bacterial pathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* using a promoter-probe plasmid. *The EMBO J.* 6; 23-28.
- OUSBOURN, A.E.; CLARKE, B.R. & DANIELS, M.J. 1990. Identification and DNA sequence of a pathogenicity gene of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 3; 280-285.

- PARKER, J.E.; BARBER, C.E.; MI-JIAO, F. & DANIELS, M.J. 1993. Interaction of *Xanthomonas campestris* with *Arabidopsis thaliana*: characterization of a gene from *X. c. pv. raphani* that confers avirulence on most *A. thaliana* accessions. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 6: 216-224.
- PIMENTA, A.L.; ROSATO, Y.B & ASTOLFI-FILHO, S. 1991. Expression of a subcloned alpha-amylase gene under the control of a *Xanthomonas campestris* promotor. *FEMS Microbiol. Lett.*, 90: 11-18.
- PINKNEY, M. & THOMAS, C.M. 1987. Replication and maintenance of promiscuous plasmids of Gram-negative bacteria. *Microbiol. Sci.*, 4: 186-191.
- PLOPAWSKY, A.R.; KAWALEK, M.D. & SCHAAD, N.W. 1993. A xanthomonadin-encoding gene cluster for the identification of pathovars of *Xanthomonas campestris*. *Mol. Plant-microbe Interact.*, 6: 545-552.
- RAMOS, G.B.A. 1994. *Caracterização da Resistência ao cobre em Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*. Dissertação de Mestrado, I.B., UNICAMP.
- ROBERTS, I.N.; DOW, J.M.; LUM, K.Y.; SCOFIELD, G, BARBER, C. & DANIELS, M.J. 1987. Antiserum against *Xanthomonas* phytopathogen inhibits host-pathogen interaction in seedlings of *Brassica campestris*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 44: 383-387.
- RODRIGUES-NETO, J.; SUGIMORI, M.H. & MALAVOLTA Jr., V.A. 1984. Raças de *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria (Doidge) Dye, no Estado de São Paulo. *Aq. Inst. Biol.*, 51: 13 - 16.
- ROGOWSKY, P.M.; CLOSE, T.J.; CHIMERA, J.A; SHAW, J.J. & KADO, C.I. 1987. Regulation of the *vir* genes of *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiC58. *J. Bacteriol.*, 169: 5101-5112.
- RONALD, P.C. & STASKAWICZ, B.J. 1988. The avirulence gene *avrBs1* from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria encodes a 50-kD protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1: 191-1988.

- ROSATO, Y.B.; DESTEFANO, S.A.L. & DANIELS, M.J. 1994. Cloning of a locus involved in pathogenicity and production of extracellular polysaccharide and protease in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *FEMS Microbiol. Lett.*, *117*: 41-46.
- SAMBROOCK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A.
- SANDFORD, P.A. 1979. Extracellular microbial polisaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, *36*: 256 - 310.
- SCHULTE, R. & BONAS, U. 1992. Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *hrp* gene cluster, wich determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. *J. Bacteriol.*, *174*: 815-823.
- SCOTT, J.R. 1984. Regulation of plasmid replication. *Microbiol. Rev.*, *48*: 1-23.
- SEAL, S.E.; COOPER, R.M. & CLARKSON, J.M. 1990. Identification of a pathogenicity locus in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Gen. Genet.*, *222*: 452-456.
- SHAW, J.J. & KADO, C.I. 1986. Development of a *Vibrio* bioluminescence gene-set to monitor phytopathoggenic bacteria during the ongoing of the disease process in a non-disruptive manner. *Biotechnology*, *4*: 560-564.
- SHAW, J.J. & KHAN, I. 1993. Efficient transposon mutagenesis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by high-voltage electroporation. *BioTechniques*, *14*: 556-558.
- SHAW, J.J.; SETTLE, L.G. & KADO, C.I. 1988. Tranposon Tn4431 mutagenesis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: characterization of a non-pathogenic mutant and cloning of a locus for pathogenicity. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, *1*: 39-45.
- SIMON, R.; O'CONNEL, M.; LABES, M. & PÜHLER, A. 1986. Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of Rhizobia and other Gram-negative bacteria. *Methods Enzimol.*, *118*: 640-659.

- SOW, P. & DEMAIN, A. L. 1979. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL - B1459. *Appl. Environ. Microbiol.*, 31: 1186 - 1192.
- STALL, R.E. & CIVEROLO, E.L. 1991. Research relating to the recent outbreak of citrus canker in Florida. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 29: 399-420.
- STALL, R.E.; LOSCHKE, D.C. & JONES, J.B. 1986. Linkage of copper resistance and avirulence loci on a self-transmissible plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. *Phytopathol.*, 76: 240-243.
- STASKAWICZ, B.; DAHLBECK, D.; KEEN, N. & NAPOLI, C. 1987. Molecular characterization of cloning avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. glycinea. *J. Bacteriol.*, 169: 5789-5794.
- STRIPECKE, R. & ROSATO, Y.B. 1988. Variabilidade no perfil eletroforético de alfa-esterases e plasmídios em patovares de *Xanthomonas campestris*. *Fitopatol. Bras.*, 13: 358-361.
- STRIPECKE, R.; ROSATO, Y.B. & ASTOLFI-FILHO, S. 1989. Subcloning and expression of the α -amilase gene from *Bacillus subtilis* in *Xanthomonas campestris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31: 512-517.
- SWANSON, J.; KEARNEY, B.; DAHLBECK, D. & STASKAWICZ, B. 1988. Cloned avirulence gene of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria complements spontaneous race-change mutants. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1: 5-9.
- SWARUP, S.; DeFEYTER, R.; BRANSKY, R.H. & GABRIEL, D.W. 1991. A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *Xanthomonas campestris* to elicit cankerlike lesions on citrus. *Phytopathol.*, 81: 802-809.
- SWARUP, S.; YANG, Y.; KINGSLEY, M.T. & GABRIEL, D.W. 1992. An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 5: 204-213.

- TAIT, R.; CLOSE, T.; LUNDQUIST, R.; HAGIVA, M.; RODRIGUEZ, R. & KADO, C.I. 1983. Construction and characterization of a versatile broad host range DNA cloning system for Gram negative bacteria. *Biotechnol.*, 1: 269-275.
- TANG, J.L.; GOUGH, C.L.; BARBER, C.E.; DOW, J.M. & 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. & DANIELS, M.J. 1990. Cloning of genes involved in negative regulation of production of extracellular enzymes and polysaccharide production 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. & DANIELS, M.J. 1991. Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol. Gen. Genet.*, 226: 409-417.
- TODD, G.A.; DANIELS, M.J. & CALLOW, J.A. 1990. *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* has DNA sequences containing genes isofunctional with *X. campestris* pv. *campestris* genes required for phytopathogenicity. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 36: 73-87.
- TU, J.; WANG, H.; CHANG, S.; CHARNG, C.; LURZ, R. & DOBRINSKI, B. 1989. Transposable elements of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* originating from indigenous plasmids. *Mol. Gen. Genet.*, 217: 505-510.
- TURNER, P.; BARBER, C. & DANIELS, M.J. 1985. Evidence for clustered pathogenicity genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol. Gen. Genet.*, 199: 338-343.

- VAN DEN MOOTER, M.; STEENACKERS, M.; MAERTENS, F.; GOSSELÉ, P.; DEVOS, P.; SWINGS, J.; KERSTERS, K. & DE LEY, J. 1987. Differentiation between *X. campestris* pv *graminis* (ISSP List 1980), pv. *phlerpratensis* (ISSP List 1980) emend., pv *poae* Egli and Schmidt 1982 and pv. *arrhenatheri* 1982, by numerical analysis of phenotypic features and protein gel electrophoregrams. *J. Gen. Microbiol.*, 130: 2983-2999.
- 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. & BRADBURY, J.F. 1990. towards a improved taxonomy of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 40: 312 - 316.
- VAUTERIN, L., SWINGS, J. & KERSTERS, K. 1991. Grouping of *Xanthomonas campestris* patovars by SDS - PAGE of proteins. *J. Gen. Microbiol.*, 137: 1677 - 1687.
- VIDAVER, A.K.; MATHYS, M.L.; THOMAS, M.E. & SCHUSTER, M.L. 1972. Bacteriocins of the phytopathogens *Pseudomonas syringae*, *P. glycinea*, and *P. phaseolica*. *Can. J. Microbiol.*, 18: 705 - 713.
- WHALEN, M.C.; STALL, R.E. & STASKAWICZ, B.J. 1988. Characterization of a gene from a tomato pathogen determining hypersensitive response in nonhost species and genetic analysis of this resistance in bean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 6743-6747.
- WHALEN, M.C.; WANG, J.F.; CARLAND, F.M.; HEISKELL, M.E., DAHBECK, D.; MINSAVAGE, G.V.; JONES, J.B.; SCOTT, J.W.; STALL, R.E. & STASKAWICZ, B.J. 1993. Avirulence gene *avrRxv* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* specifies resistance on tomato line Hawaii 7998. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 6: 616-627.
- WHITE, T.J. & GONZALES, C.F. 1991. Application of electroporation for efficient transformation of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. *Phytopathology*, 81; 521-524.

- YOUNG, A. & BLAKESLEY, R. 1991. Sequencing plasmids from single colonies with ds DNA cycle sequencing system. *Focus*, 13: 13.
- YOUNG, J. M.; TAKIKAWA, Y.; GARDAN, L. & STEAD, D. E. 1992. Changing concepts in the taxonomy of plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 30: 67 - 105.