

Este exemplar corresponde à redação final da Tese defendida pela candidata Suzete Ap. L. Destefano e aprovada pela Comissão julgadora.

Campinas 24/2/89.



Y. Bomura

Introdução do transposon Tn5 em Xanthomonas campestris pv. campestris e análise dos recombinantes quanto à auxotrofia, fitopatogenicidade e aumento de viscosidade

50983

BC/10489

IB/80983

SUZETE APARECIDA LANZA DESTEFANO

Orientadora: Profa. Dr^a Yoko Bomura Rosato

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de Genética de Microrganismos.

Campinas - São Paulo

T/UNICAMP

1989

D473_i



CLASSIF.	7
AUTOR.	D473 I
V.	EX.
TOMBO BCI	10489
18/875	

18/ 80983

34/ 10489

Aos meus pais,

Oswaldo e Alzira

E ao meu marido, Ricardo

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- À Profa. Dra. Yoko Bomura Rosato pela excelente orientação, amizade, apoio e incentivo.
- Aos Profs.: Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner, Dr. Vanderlei Perez Canhos e Dr. Rolf Dieter Illg pela análise prévia desta.
- Ao Prof. Dr. Aquiles Eugênio Piedrabuena pela amizade, disponibilidade, paciência e grande auxílio na parte estatística.
- Ao Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho pelas sugestões e gentileza na utilização do laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília.
- Ao Prof. Júlio Rodrigues Neto pela acessibilidade e sugestões.
- Ao meu marido, essencial à minha vida, pelo amor, confiança, incentivo, amizade e companheirismo incalculáveis.
- Aos meus pais, que me apoiaram e possibilitaram meus estudos sempre com muito amor, carinho e incentivo.
- À minha avó, Linda, pelo amor, carinho e companheirismo constantes.
- À Rosana Midori Tibana pela amizade e colaboração.
- À Sandra Martins e Wilson Donizetti pela amizade e auxílio técnico.
- Às amigas: Adriana Vicente, Rejane Maria Cássia, Andréa de Lima Pimenta, Renata Stripecke, Rosângela Ap. Rodrigues,

Nairlídia Salmi e Ione Pinto de Almeida pela amizade e companheirismo.

- Às alunas de pós-graduação: Jaqueline, Alejandra, Nanci, Helena, Laura, Márcia, Fátima, Luciane, Cristiane e Roseli pelo coleguismo.

- Aos funcionários e professores do Departamento de Genética e Evolução.

ABREVIATURAS

ATP	- adenosina trifosfato
CPS	- centipoise
DNA	- ácido desoxirribonucleico
EDTA	- ácido etilenodiaminotetracético
Kb	- mil pares de base
Km	- kanamicina
mA	- miliampere
pb	- pares de bases
PEG	- polietilenoglicol
RNA	- ácido ribonucleico
RNAse	- ribonuclease
SDS	- dodecilsulfato de sódio
Sm	- estreptomicina
TRIS	- tris (hidroximetil) aminometano
U	- unidade de atividade enzimática
UV	- ultra-violeta

Conteúdo

	Pág.
1. Introdução.....	1
2. Revisão de literatura.....	3
2.1 Fitopatogenicidade.....	3
2.2 Goma xantana.....	9
2.3 Mutagênese com o uso de transposons.....	13
2.3.1 Definição e classificação.....	13
2.3.2 Utilização do Tn5.....	17
3. Materiais e Métodos.....	21
3.1 Linhagens.....	21
3.2 Meios de cultura.....	21
3.2.1 Meio Completo YM.....	21
3.2.2 Meio de Produção I.....	22
3.2.3 Meio Completo LB (LURIA BERTANI).....	22
3.3 Conjugação.....	22
3.4 Digestão do probe com enzima de restrição Hind III.....	23
3.5 Hibridação de colônia por "dot blot".....	24
3.5.1 Pré-hibridação.....	25
3.5.2 Hibridação.....	25
3.6 Teste de fitopatogenicidade.....	29
3.6.1 Teste " <u>in vitro</u> ".....	29
3.6.2 Teste " <u>in vivo</u> ".....	30
3.7 Fermentação dos recombinantes.....	30

3.8	Extração de plasmídios em grande escala.....	31
3.9	Extração de plasmídios em pequena escala.....	33
3.10	Precipitação da goma.....	36
3.10.1	Teste de viscosidade à várias temperaturas.....	37
3.10.2	Teste de viscosidade a vários pHs.....	37
4.	Resultados.....	38
4.1	Transferência do Tn5 para <u>Xanthomonas campestris</u> pv. <u>campestris</u>	38
4.2	Hibridação.....	39
4.3	Seleção de mutantes para auxotrofia.....	39
4.4	Seleção de mutantes para fitopatogenicidade....	39
4.5	Seleção de mutantes para maior viscosidade....	43
4.5.1	Análise dos recombinantes quanto à viscosidade.....	60
4.5.2	Análise de viscosidade à várias temperaturas.....	66
4.5.3	Análise de viscosidade à vários pHs....	71
4.5.4	Análise de viscosidade à pH 1.0.....	71
4.5.5	Análise de viscosidade à pH 11.0.....	76
5.	Discussão.....	81
5.1	Transferência do Tn5 para <u>Xanthomonas campestris</u> pv. <u>campestris</u>	81

5.2	Análise de auxotróficos.....	83
5.3	Teste de fitopatogenicidade.....	84
5.4	Viscosidade dos recombinantes.....	86
5.4.1	Análise da goma produzida pelos recombinantes.....	90
6.	Conclusões.....	92
7.	Resumo.....	94
8.	Summary.....	96
9.	Referências Bibliográficas.....	97

Lista de TABELAS, GRÁFICOS e FIGURAS

TABELA 1: Valores de viscosidade dos recombinantes contendo Tn5 (em CPS) à 20 rpm, experimento 1.....	44
TABELA 2: Valores de viscosidade dos recombinantes contendo Tn5 (em CPS) à 20 rpm, experimento 2.....	45
TABELA 3: Valores de viscosidade dos recombinantes contendo Tn5 (em CPS) à 20 rpm, experimento 3.....	46
TABELA 4: Valores de viscosidade dos recombinantes contendo Tn5 (em CPS) à 20 rpm, experimento 4.....	47
TABELA 5: Valores de viscosidade dos recombinantes contendo Tn5 (em CPS) à 20 rpm, experimento 5.....	48
TABELA 6: Valores de viscosidade dos recombinantes contendo Tn5 (em CPS) à 20 rpm, experimento 6.....	49
TABELA 7: Teste de TUKEY para as médias de viscosidade dos recombinantes com Tn5, experimento 1.....	53
TABELA 8: Teste de TUKEY para as médias de viscosidade dos recombinantes com Tn5, experimento 2.....	54
TABELA 9: Teste de TUKEY para as médias de viscosidade dos recombinantes com Tn5, experimento 3.....	55
TABELA 10: Teste de TUKEY para as médias de viscosidade dos recombinantes com Tn5, experimento 4.....	56
TABELA 11: Teste de TUKEY para as médias de viscosidade dos recombinantes com Tn5, experimento 5.....	57
TABELA 12: Teste de TUKEY para as médias de viscosidade dos recombinantes com Tn5, experimento 6.....	58

TABELA 13: Valores de viscosidade da goma das linhagens selecionadas, em CPS, à várias rotações.....	62
TABELA 13a: Teste de FRIEDMAN para os valores de viscosidade à várias rotações.....	63
TABELA 13b: Valores de viscosidade convertidos em valores logarítmicos.....	64
TABELA 14: Valores de viscosidade da goma das linhagens selecionadas, em CPS, à várias temperaturas à 100 rpm.....	67
TABELA 14a: Teste de FRIEDMAN para os valores de viscosidade à várias temperaturas.....	68
TABELA 14b: Valores de viscosidade convertidos em valores logarítmicos	69
TABELA 15: Valores de viscosidade da goma das linhagens selecionadas, em CPS, a pH 1.0.....	72
TABELA 15a: Teste de FRIEDMAN para os valores de viscosidade a pH 1.0.....	73
TABELA 15b: Valores de viscosidade convertidos em valores logarítmicos.....	74
TABELA 16: Valores de viscosidade da goma das linhagens selecionadas, em CPS, a pH 11.0.....	77
TABELA 16a: Teste de FRIEDMAN para os valores de viscosidade a pH 11.0.....	78
TABELA 16b: Valores de viscosidade convertidos em valores logarítmicos.....	79
GRÁFICO 1: Valores de viscosidade, em log, da goma das linhagens selecionadas, à várias rotações.....	65

GRÁFICO 2: Valores de viscosidade, em log, da goma das linhagens selecionadas à várias temperaturas.....	70
GRÁFICO 3: Valores de viscosidade, em log, da goma das linhagens selecionadas a pH 1.0.....	75
GRÁFICO 4: Valores de viscosidade, em log, da goma das linhagens selecionadas, a pH 11.0.....	80
FIGURA 1: Teste de fitopatogenicidade " <u>in vitro</u> ".....	42
FIGURA 2: Teste de fitopatogenicidade " <u>in vivo</u> ".....	42

Lista do apêndice

Apêndice 1: Análise de variância, experimento 1.....	114
Apêndice 2: Análise de variância, experimento 2.....	114
Apêndice 3: Análise de variância, experimento 3.....	114
Apêndice 4: Análise de variância, experimento 4.....	115
Apêndice 5: Análise de variância, experimento 5.....	115
Apêndice 6: Análise de variância, experimento 6.....	115
Apêndice 7: Peso seco da goma das linhagens num total de 100 ml de caldo de fermentação.....	116
Apêndice 8: Teste de paralelismo entre as retas obtidas na análise de viscosidade à várias rotações.....	117
Apêndice 9: Teste de paralelismo entre as retas obtidas na análise de viscosidade à várias temperaturas.....	118
Apêndice 10: Teste de paralelismo entre as retas obtidas na análise de viscosidade em pH 1.0.....	119
Apêndice 11: Teste de paralelismo entre as retas obtidas na análise de viscosidade em pH 11.0.....	120
Apêndice 12: Viscosidade dos recombinantes contendo Tn5 (em CPS) à 100 rpm, experimento 1.....	121
Apêndice 13: Viscosidade dos recombinantes contendo Tn5 (em CPS) à 100 rpm, experimento 2.....	122
Apêndice 14: Viscosidade dos recombinantes contendo Tn5 (em CPS) à 100 rpm, experimento 3.....	123
Apêndice 15: Viscosidade dos recombinantes contendo Tn5 (em CPS), experimento 4.....	124

Apêndice 16: Viscosidade dos recombinantes contendo Tn5 (em CPS) à 100 rpm, experimento 5.....	125
Apêndice 17: Viscosidade dos recombinantes contendo Tn5 (em CPS) à 100 rpm, experimento 6	126

INTRODUÇÃO

Xanthomonas campestris é uma bactéria fitopatogênica responsável pela podridão negra de diversas espécies vegetais: couve, feijão, mandioca, algodão, laranja, tomate, pimentão, nabo, etc. (WILLIAMS, 1980).

O mecanismo de patogenicidade de Xanthomonas campestris vem sendo amplamente estudado principalmente na área de biologia molecular no intuito de se compreender a interação bactéria-planta e de se detectar os genes envolvidos no processo de infecção. (DANIELS *et al.*, 1987).

Paralelamente ao poder de infecção em plantas, a bactéria Xanthomonas campestris secreta um biopolímero que industrialmente é conhecido como goma xantana (JEANES *et al.*, 1961). A produção deste exopolissacarídeo (EPS) fornece uma alternativa importante para diversas indústrias do país em substituição às gomas de origem vegetal, pois a goma xantana é estável à alterações de pH e temperatura, compatível com altas concentrações de sais e produz alta viscosidade mesmo à baixas concentrações.

Atualmente, no Brasil, a goma xantana é totalmente importada e seu alto custo restringe o seu campo de aplicação. Assim estudos de melhoramento genético e de fermentação estão sendo realizados visando, futuramente, a produção nacional deste biopolímero.

A mutagênese induzida por transposons, especialmente o Tn-5, tem se mostrado extremamente importante, permitindo além do isolamento de mutantes, a identificação de genes relacionados com diferentes processos.

O presente trabalho teve por objetivo introduzir o transposon Tn-5 em Xanthomonas campestris pv. campestris e avaliar os diversos mutantes quanto á auxotrofia, fitopatogenicidade e aumento de viscosidade. Com respeito ao último tipo de mutante citado, pretendeu-se, também, comparar a goma dos recombinantes mais viscosos com a goma Keltrol, utilizada comercialmente.

2. Revisão de literatura

As bactérias fitopatogênicas gram-negativas dividem-se em quatro gêneros: *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. O gênero *Xanthomonas* (DOWSON, 1939), da família Pseudomonadaceae, consiste de cinco espécies: *X. albilineans*, *X. ampelina*, *X. axonopodis*, *X. fragariae* e *X. campestris*. Esta última, utilizada no presente trabalho, está dividida em mais de 120 patovares os quais são determinados somente após a infecção no hospedeiro do qual a bactéria foi isolada (DYE et al., 1980). As colônias de *Xanthomonas campestris* são amarelas, mucóides, e o diâmetro destas varia de uma linhagem para outra.

2.1 Fitopatogenicidade

A bactéria *Xanthomonas campestris* é responsável por vários danos causados á várias espécies vegetais de acordo com seus patovares. O patovar *campestris*, utilizado no presente trabalho, é o agente causal da podridão negra em crucíferas, doença que provoca danos consideráveis em qualquer lugar do mundo (WILLIAMS, 1980). O sinal característico desta podridão é o amarelecimento das folhas, com posterior coloração marrom no ponto de infecção e nos veios da folha. Plantas jovens, quando infectadas, morrem em poucos dias e é muito comum o definhamento destas. Análises

de veios enegrecidos, ao microscópio, mostram massas de bactérias em forma de gotas ao longo de todo o vaso.

As mais variadas técnicas de inoculações em laboratório podem alterar o tempo de aparecimento dos sintomas, mas nunca o sinal característico de podridão negra. Técnicas mais rápidas e mais comuns têm sido utilizadas por diferentes autores: infiltração com uma seringa na superfície inferior da folha de couve, plantas esborrifadas (spray) com suspensões de bactérias (DANIELS *et al.*, 1984a), picada com agulha ou mesmo com alça de platina no pecíolo da folha (SHAW *et al.*, 1988) ou então uma pequena lesão pode ser feita na epiderme da folha com o auxílio de uma alça de platina coberta de bactérias.

A partir do ponto de inoculação a bactéria penetra no espaço intercelular através dos estômatos e portanto é imprescindível que estes estejam bem abertos durante a inoculação. Para isto, basta colocar a planta numa câmara úmida por 24 horas antes da inoculação.

DANIELS *et al.* (1984a) utilizaram a técnica de picada com alça de platina em plântulas e o aparecimento dos sintomas foi observado após 4 ou 5 dias. Observaram também que a progressão da doença é idêntica á 18 °C, 20 °C ou 32 °C.

No campo, Xanthomonas campestris pv. campestris é dispersa por fatores tais como chuva e vento e penetra nas plantas através das aberturas naturais (SMITH, 1897; COOK *et al.*, 1952).

Pouco se conhece sobre o mecanismo de patogenicidade em *X. campestris* pv. *campestris* e estudos têm sido realizados com o intuito de se compreender melhor o mecanismo de infecção e a relação planta-bactéria.

Recentes trabalhos na área de biologia molecular têm acelerado este processo. Já foram descritos genes de patogenicidade, genes estruturais de enzimas extracelulares relacionadas à degradação da parede celular da planta tais como amilases, ligninases e celobiases; e genes que controlam a síntese e secreção destas enzimas (DANIELS *et al.*, 1987).

DANIELS *et al.* (1984b) construíram um banco genômico do DNA de uma linhagem selvagem, portanto patogênica, de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e este foi transferido para mutantes não patogênicos. Os recombinantes foram testados quanto à patogenicidade e foram isolados dois plasmídios recombinantes que restauraram a patogenicidade completa.

De acordo com DANIELS *et al.* (1984 a) existem 4 tipos de mutantes: 1) mutante que não causa sintomas visíveis; 2) que causa resposta localizada (círculo enegrecido e opaco ao redor do ponto de inoculação); 3) que causa sintomas parciais da doença (área enegrecida translúcida) porém não se propaga, nem causa apodrecimento; 4) que apresenta porcentagem de infecção reduzida (de 10 à 20%).

A definição de um mutante para fitopatogenicidade, segundo DANIELS *et al.* (1987), seria aquele que não

apresenta deficiência visível no crescimento fora da planta, é prototrófico, cresce à razões normais e, de alguma forma, tem sua interação com plantas alterada, acarretando modificações nos sintomas característicos da doença. Contudo não só os genes responsáveis pela fitopatogenicidade devem ser considerados, mas também aqueles que estão envolvidos na relação patógeno-hospedeiro (DANIELS *et al.*, 1984a).

Assim, a caracterização preliminar de um mutante de patogenicidade inclui: habilidade de crescer em plântulas, virulência, habilidade de produzir certas enzimas extracelulares e de provocar resposta de hipersensibilidade em uma planta não hospedeira (DANIELS *et al.*, 1984a).

Contudo há outro critério a ser considerado: genes de fitopatogenicidade que mostram diferentes expressões na bactéria crescendo *in* ou *ex* planta. É sabido que genes de virulência de Agrobacterium tumefaciens são induzidos por substâncias da planta (STACHEL *et al.*, 1985) e que genes de nodulação de Rhizobium são similarmente controlados (SHERMAN *et al.*, 1986). Portanto, a resposta de plantas à infecção tem sido amplamente estudada a partir da identificação de genes cujo nível de expressão muda segundo a infecção.

OSBURN *et al.* (1987) isolaram fragmentos de DNA de Xanthomonas campestris pv. campestris contendo promotores que são funcionais durante o processo de infecção.

STASKAWICZ *et al.* (1984) estudaram a interação de Pseudomonas syringae pv. glycinea com soja. Espécies deste patógeno são caracterizadas por interações específicas com

certos cultivares levando à compatibilidade, ou seja, à doença; ou incompatibilidade (resposta de hipersensibilidade da planta, levando à uma rápida interrupção na multiplicação bacteriana).

DANIELS *et al.* (1987) construíram um banco genômico de Xanthomonas campestris pv. vitians, cujo hospedeiro é a alface, e transferiram para Xanthomonas campestris pv. campestris (hospedeiro-brássicas). Os plasmídios recombinantes foram incapazes de causar doença em Brassica spp, demonstrando assim, a especificidade patógeno-hospedeiro.

Com relação ao sintoma de podridão negra é sabido que o patovar vesicatoria é capaz de infectar brássicas (SHACKLETON, 1966) e embora pouco seja conhecido sobre a relação entre patovares campestris e zinniae, DANIELS *et al.*, (1984a) observaram que ambos patovares causam sintomas de podridão negra em plântulas de Zinnia elegans.

Além dos genes de fitopatogenicidade, certos autores acreditam que há outros possíveis fatores para a patogenicidade, por exemplo, enzimas pectolíticas (STARR e NASUNO, 1967), xantana (SUTTON e WILLIAMS, 1970) e substâncias fitotóxicas (NODA *et al.*, 1980., PERREAUX *et al.*, 1982).

Entretanto polissacarídeos extracelulares produzidos por Xanthomonas campestris pv. campestris (xantana) mostraram-se não muito importantes para a produção de sintomas, segundo BARRERE *et al.*, (1986).

TANG *et al.* (1987), utilizando mutagênese com transposon Tn5, obtiveram alguns mutantes de Xanthomonas campestris pv. campestris deficientes na produção da enzima protease e analisaram a patogenicidade destes em nabo. Concluíram que a protease extracelular não é imprescindível na patogenicidade de Xanthomonas campestris pv. campestris, contudo pode, talvez, atuar de alguma forma no desenvolvimento da doença.

Muitos patovares de Xanthomonas campestris produzem proteases que degradam o leite (DYE, 1962) e REDDY *et al.* (1971) sugerem que estas enzimas têm atuação na degradação da parede celular. Entretanto GHOLSON e ESSENBERG (1986) demonstraram que mutantes deficientes da enzima protease de X. campestris pv. malvacearum mantiveram a patogenicidade em plantas de algodão.

Portanto, ainda não há evidências concretas sobre a existência de enzimas extracelulares que atuam no papel de patogenicidade ou se existem, quais são elas.

Alguns trabalhos publicados sugerem que o exopolissacarídeo (EPS), secretado por muitas bactérias fitopatogênicas, é também um fator de patogenicidade, pois espécies deficientes em EPS são usualmente avirulentas (KELMAN, 1954).

Contudo BARRERE *et al.* (1986), clonando genes envolvidos na produção do polissacarídeo xantana de X. campestris pv. campestris, obtiveram mutantes deficientes na produção de EPS que mantiveram a

patogenicidade. Porém este trabalho não pode concluir se, realmente, o EPS não atua na patogenicidade.

Assim, não foi registrado, ainda, uma correlação direta entre habilidade para síntese de xantana e patogenicidade.

Estudos com espécies de Rhizobium demonstraram a correlação entre a síntese de exopolissacarídeo e a nodulação em plantas de ervilha e feijão (BORTHAKUR *et al.*, 1986 e LEIGH *et al.*, 1985).

2.2 Goma Xantana

A produção de polissacarídeo extracelular por microorganismos fitopatogênicos pode ter três explicações : a) o polissacarídeo serve como uma barreira protetora contra condições adversas do meio ambiente (WILKINSON, 1958); b) facilita a adesão de células bacterianas à superfície de plantas (COSTERTON *et al.*, 1981); c) obstrui os vasos das plantas (SUTTON *et al.*, 1970).

A goma xantana é um polissacarídeo de importância comercial. Sua estrutura é um pentassacarídeo com esqueleto de glucose e ramificação de manose e ácido glucorônico. Radicais de acetato e piruvato presentes na estrutura da xantana alteram o fator viscosidade (CADMUS *et al.*, 1976; SANDFORD e BAIRD, 1983).

A partir de 1961 a xantana passou a ser produzida comercialmente e em 1969 esta foi aprovada para o uso em alimentação humana.

Quanto às propriedades, a xantana produz soluções de alta viscosidade à baixas concentrações; a solução da goma é altamente pseudoplástica (viscosidade diminui com aumento de tensão de cisalhamento - processo reversível); é estável à variações de temperatura e pH; é compatível com altas concentrações de sais (JEANES *et al.*, 1961). Segundo ROCKS (1971) a viscosidade é independente do pH entre 6.0 e 9.0 porém ocorrem algumas alterações entre 1,0 e 11,0.

Na área alimentícia a goma xantana é amplamente utilizada devido à alta estabilidade à temperatura e pH. Pode ser adicionada à conservas, laticínios, produtos de panificação, alimentos congelados, sorvetes, molhos (como agente espessante). Pode ser utilizada também como agente suspensivo em bebidas preparadas com suco de frutas (COTTRELL, 1979).

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

Devido à sua estabilidade ao pH e pseudoplasticidade, a xantana também é aplicada na perfuração de poços de petróleo (WELLS, 1977) e na recuperação melhorada de óleos (SANDVIK e MAERKER, 1977).

A produção de goma xantana é efetuada através da fermentação de sacarose, num processo de duas etapas, onde numa primeira fase é promovido o crescimento de bactérias em um meio complexo e numa segunda etapa, essa massa celular é

colocada em um meio de fermentação, de composição definida (SOW e DEMAINE, 1979).

WALSH *et al.*, (1984) introduziram o transposon da lactose, Tn 951, em *Xanthomonas campestris* com o objetivo de se utilizar a lactose como um substrato alternativo. Os recombinantes apresentaram atividade específica da beta-galactosidase de até 200 vezes mais que o tipo selvagem, porém estes não foram testados para a produção de xantana.

Atualmente têm sido realizados estudos na área de genética molecular com o objetivo de se melhorar a produção de goma xantana a partir da identificação de genes essenciais à síntese desta.

HARDING *et al.*, (1987) clonaram vários genes essenciais para a produção de xantana em mutantes não mucóides e isolaram um plasmídeo contendo um fragmento de 12,4 Kb o qual possui um grupo de, pelo menos, quatro genes ligados que participam da biossíntese da goma xantana. A introdução deste plasmídeo na linhagem selvagem NRRL-B1459 de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* aumentou em 10% a produção de xantana e a piruvatação da cadeia de xantana em 45%. Este fato vem confirmar a hipótese de que os radicais de piruvato têm influência na viscosidade. Este trabalho também propõe a existência de oito enzimas que estariam envolvidas na síntese do polímero xantana: cinco transferases específicas, acetilase, ceto-transferase e polimerase. É suposto também que uma enzima específica possa estar envolvida na liberação do polissacarídeo.

BARRERE *et al.*, (1986), já citado anteriormente, clonaram genes relacionados com o biossintese de xantana com o objetivo de correlacionar goma e fitopatogenicidade.

THORNE *et al.* (1987) clonaram fragmentos de DNA do tipo selvagem de Xanthomonas campestris pv. campestris (linhagem NRRL-B1459) em Escherichia coli e estes foram posteriormente transferidos para mutantes não mucóides de Xanthomonas campestris. Os fragmentos clonados que restauraram a síntese da goma xantana foram comparados de acordo com o padrão de restrição e por complementação de mutações específicas. Neste trabalho foram definidos pelo menos três loci, não ligados, com genes para biossintese de xantana. Linhagens do tipo selvagem carregando cópias múltiplas de plasmídios com genes para biossintese de xantana foram testadas para a produção da goma e foi verificado um aumento da xantana em 20%, havendo casos em que a produção dobrou.

MARQUET *et al.* (1989) realizaram fermentações com mutantes resistentes a antibióticos e posteriormente introduziram um plasmídio recombinante carregando genes essenciais para a síntese de xantana, obtido por THORNE *et al.* (1987) citado acima. Os autores observaram que quando os mutantes carregavam cópias múltiplas dos genes da xantana, a quantidade de goma era aumentada.

2.3 Mutagênese com uso de transposons

A genética molecular, recentemente, tem utilizado elementos transponíveis, ou transposons, como agentes mutagênicos. Estudos neste sentido têm demonstrado que a inserção de um elemento de resistência à droga no genoma de *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* (KLECKNER *et al.*, 1975) pode levar à uma variedade de mutações auxotróficas e sugerem também que a maioria, senão todos, os genes destes organismos podem ser mutados por inativação insercional.

KLECKNER *et al.* (1977) descreveram as propriedades físicas e genéticas de vários elementos resistentes à drogas e discutiram seus potenciais, assim como estratégias específicas para mutagênese numa variedade de microrganismos.

2.3.1 Definição e classificação

Elementos transponíveis são pequenos segmentos de DNA que têm a capacidade de se inserir em diferentes sítios do genoma de organismos. Estes elementos mutam genes por inserção, alteram a expressão de genes vizinhos, provocam a formação de deleções e rearranjos no genoma, ajudam na propagação de genes entre espécies de populações bacterianas e servem como instrumento para análise genética e molecular (CALOS e MILLER, 1980; KLECKNER, 1981). Quando são pequenos (menos de 2000 pares bases) são denominados IS ou sequências

de inserção. Codificam somente determinantes para sua própria transposição. São organizados compactamente, contendo um ou mais genes estruturais da proteína transposase, informação regulatória e determinantes de transposição, tudo dentro de uma capacidade de codificação muito limitada.

Elementos maiores, que codificam determinantes genéticos adicionais tais como resistência à antibióticos, são denominados de transposons. Estes são flanqueados por sequências repetidas invertidas ou diretas. São denominados também de elementos compostos.

O transposon Tn-5, utilizado no presente trabalho, é considerado um elemento composto pertencente à classe I (KLECKNER, 1981). Já foi mapeado (JORGENSEN *et al.*, 1979) e seu tamanho é de aproximadamente 5700 pares de bases (pb), possui duas sequências repetidas invertidas cada uma com 1534 pb denominados IS 50R, ou braço direito e IS 50L, ou braço esquerdo (JORGENSEN *et al.*, 1979; BERG *et al.*, 1980, 1982; ISBERG e SYVANEN, 1981) os quais possuem 8 pb terminais repetidos invertidos. Estes braços limitam uma região central de 2700 pb. Quando se transpõe, o Tn-5 gera 9 pb na duplicação do DNA alvo.

O DNA do Tn-5 codifica a enzima neomicina fosfo-transferase II também denominada de NPT II responsável pela resistência aos antibióticos kanamicina (Km) e neomicina (Nm) e codifica também funções de transposição (SASAKAWA *et al.*, 1982).

O gene estrutural para NPT II compreende uma região de aproximadamente 1275 bp limitada pelo sítio Hind III na sequência repetida invertida esquerda e pelo sítio Sma I na região central única (SASAKAWA *et al.*, 1982).

Recentemente foi descoberto que o Tn-5 carrega um determinante para resistência à estreptomicina (Sm) expressa em *Methylobacterium organophilum* (MAZODIER *et al.*, 1982) e em *Rhizobium meliloti* (PUTNOKY *et al.*, 1983; FORRAI *et al.*, 1983).

GENILLOUD *et al.* (1984) reportaram que o Tn-5 codifica resistência também à bleomicina (Bm). O gene responsável por esta resistência foi mapeado e concluiu-se que : 1) este gene é diferente dos outros dois (Km e Sm); 2) o gene de resistência à bleomicina é controlado pelo mesmo promotor que para o gene de resistência à kanamicina/neomicina; 3) os três genes responsáveis pela resistência à Nm, Bm e Sm estão localizados no mesmo operon.

O braço direito ou IS 50R codifica a enzima transposase responsável pela transposição do Tn-5 (LOWE *et al.*, 1983).

O braço esquerdo ou IS 50L possui um alelo mutante "ocre" do gene da transposase e um gene promotor para resistência à kanamicina (ROTHSTEIN *et al.*, 1980; ROTHSTEIN e REZNIKOFF, 1981; AUERSWALD, LUDWIG e SCHALLER, 1980).

Mutações no braço esquerdo alteram a frequência de transposição porém não evitam sua ocorrência, ou seja a transposição pode ocorrer na ausência deste (SASAKAWA *et al.*, 1982).

A diferença na capacidade de codificação entre os dois braços é causada pela diferença de um simples par de bases (T/A). Este par no braço esquerdo resulta na presença de um códon sem sentido no braço direito (SASAKAWA *et al.*, 1982).

Segundo LOWE *et al.* (1983) a transposição pode ser regulada por: 1) repressão da síntese da transposase; 2) ligação de um inibidor à proteína transposase; 3) ligação de um inibidor à sequência de DNA que a transposase deve reconhecer quando esta media a transposição. Estudos neste sentido demonstraram que o IS 50R, sozinho, inibe a transposição, ou seja, a inibição é mediada por um produto da transposase.

A presença do Tn5 inibe a transposição de um segundo Tn5 na mesma célula. Plasmídios com sequências somente de IS 50R inibem a transposição do Tn5, mostrando assim que o inibidor é codificado pelo braço direito. O outro braço (IS 50L) não participa de nenhum tipo de inibição na transposição do Tn5 (BIEK e ROTH, 1980 a,b).

LOWE *et al.* (1983) determinaram que este inibidor é uma proteína de 421 aminoácidos.

JOHNSON e REZNIKOFF (1984) analisaram as proteínas codificadas pelos braços direito (proteínas 1 e 2) e esquerdo (proteínas 3 e 4) e concluíram que: 1) a proteína 1 é necessária para que ocorra a transposição. Elementos sem a proteína 1 são incapazes de se transpor, porém são igualmente ativos em reduzir a transposição; 2) altas concentrações da proteína 2 inibem a transposição do Tn5; 3)

as proteínas 3 e 4 do braço esquerdo (IS 50L) não contém a transposase e também não possuem atividade inibitória.

2.3.2 Utilização do Tn5

O elemento Tn5 tem sido uma ferramenta muito versátil nas análises genéticas de algumas bactérias. A mutagênese com Tn5 facilita a clonagem de genes ou regiões do cromossomo para as quais não é possível seleção direta. Pode também contribuir na construção de mapas genéticos de segmentos de DNA de interesse.

CUPPELS (1986) introduziu o Tn5 em Pseudomonas syringae pv. tomato e analisou o aparecimento de mutantes auxotróficos e avirulentos. Foi detectado que o Tn5 se inseriu em sítios únicos do cromossomo e que as mutações, induzidas por este, são relativamente estáveis nesta bactéria. A porcentagem de auxotróficos foi de 1% e os mutantes de virulência foram analisados quanto à capacidade de causar necrose no tecido da planta e reação de hipersensibilidade em folhas de fumo.

NIEPOLD et al. (1985) utilizaram mutagênese com o Tn5 para identificar e isolar sequências essenciais para patogenicidade em Pseudomonas syringae pv. syringae. Fragmentos de um mutante não patogênico (induzido pelo Tn5) foram clonados em plasmídios e estes foram introduzidos em Escherichia coli. Transformantes carregando a marca Km do Tn5 foram digeridos e os fragmentos que supostamente

continham o Tn5 foram subclonados em outro plasmídio. Foi feita a digestão dupla do Tn5 neste plasmídio, os fragmentos foram marcados radioativamente e foi realizada hibridação com o banco genômico da espécie patogênica. A partir de análises de mapeamento foi detectada uma região de aproximadamente 8.5 Kb que é essencial para a restauração da patogenicidade e resposta de hipersensibilidade no mutante de Pseudomonas.

SALCH e SHAW (1988) isolaram e caracterizaram genes de patogenicidade em Pseudomonas syringae pv. tabaci, a partir de mutagênese com Tn5.

MEADE *et al.* (1982) analisaram mutantes simbióticos e auxotróficos de Rhizobium meliloti também através do uso de Tn5 e concluíram que o Tn5 não se transpõe facilmente para novos sítios, uma vez que já tenha se inserido. A frequência de auxotróficos detectada foi de 0.3%, de mutantes para nodulação (nod^-), 0.07% e de mutantes para fixação de nitrogênio (fix^-), 0.08%.

Mutantes para diferentes fontes de carbono, a partir da introdução do Tn5 em Rhizobium meliloti, foram obtidos por DUNCAN (1981). Foram detectados, pelo menos, dois mutantes: um para manitol e outro para xilose.

DITTA (1986) descreveu várias técnicas para a mutagênese com Tn5 em Rhizobium com o objetivo de se mapear genes relacionados com a fixação de nitrogênio.

SHAW e BERG (1979) isolaram, identificaram e caracterizaram mutantes auxotróficos de Escherichia coli K-12 a partir da inserção do Tn5.

O Tn5 também foi utilizado para obtenção de mutantes em Erwinia amylovora (STEINBERGER e BEER, 1988). Mutantes de patogenicidade foram analisados quanto à perda de patogenicidade, redução na virulência, perda da habilidade de causar reação de hipersensibilidade em fumo, redução desta e diminuição da produção de exopolissacarídeo. Os autores concluíram que o exopolissacarídeo atua como um fator de virulência em Erwinia amylovora. Através de testes de complementação identificaram genes relacionados com a indução de reação de hipersensibilidade e interação com hospedeiro, e evidenciaram que genes de patogenicidade e determinantes de hipersensibilidade estão intimamente ligados e que são interdependentes.

O comportamento do Tn5 também foi analisado em Xanthomonas campestris. Além da análise de mutantes também foi verificada a frequência de transposição e a sua permanência na célula (TURNER et al., 1984). Os autores concluíram que o Tn5 se transpõe em baixa frequência em Xanthomonas campestris quando comparado com a transposição em Escherichia coli e que a sua permanência na célula receptora depende, também, do tipo de plasmídeo que o carrega.

TANG et al (1987) utilizaram mutagênese com Tn5 para verificar se a enzima protease atua no processo de

patogenicidade em Xanthomonas campestris. Através da inserção do Tn5 em clones com atividade extracelular da protease foi possível a identificação de regiões portadoras de genes responsáveis pela produção desta enzima. Testes de patogenicidade foram realizados e foi verificado que a protease não atua de forma crítica na fitopatogenicidade de Xanthomonas campestris.

BARRERE *et al.* (1986) utilizaram mutagênese com Tn5 para localizar regiões responsáveis pela produção de exopolissacarídeo em Xanthomonas campestris pv. campestris. A inserção do Tn5 em plasmídios que restauram o fenótipo exopolissacarídeo (+) e análises de restrição, permitiram a localização de regiões contendo genes envolvidos na produção do biopolímero.

TURNER *et al.* (1985) introduziram o Tn5 em um plasmídio contendo fragmentos do DNA de Xanthomonas campestris, que restaura a produção de sintomas em mutantes não patogênicos. Posteriormente foi feita a identificação de uma região de aproximadamente 10 Kb contendo genes envolvidos no processo de infecção.

3. Materiais e Métodos

3.1 Linhagens:

A linhagem selvagem de Xanthomonas campestris pv. campestris NRRL B-1459 foi obtida de Peoria (U.S.A.). O mutante Sm^R foi obtido a partir de mutação espontânea da linhagem NRRL B-1459 (LANZA e ROSATO, 1986).

A linhagem de Escherichia coli contendo o transposon Tn5, WR 6016 F⁺ λ 114 lac::Tn5, Km^R (SANSONETTI *et al.*, 1982) foi cedida pela Profa. Dra. Ana Coelho da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ.

O probe do Tn5, 803/pKan 2, Amp^R foi cedido pela Profa. Dra. Y.B. Rosato da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP (dados não publicados).

3.2 Meios de cultura

3.2.1 Meio completo YM

Extrato de malte	3.0 g
Extrato de leveduras	3.0 g
Peptona	5.0 g
Sacarose	10.0 g
Ágar em pó	15.0 g
Água destilada	1000 ml

pH 7.0

O meio foi autoclavado à 120 °C/1 atmosfera por 20 minutos.

3.2.2 Meio de Produção I (MPI)

KH_2PO_4	5.0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.0 g
Ácido cítrico	2.0 g
H_3BO_3	0.006 g
ZnO	0.006 g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0024 g
CaCO_3	0.02 g

O pH foi ajustado para 7.0 com NaOH ou HCl.

3.2.3 Meio Completo LB (LURIA BERTANI)

Triptona	10.0 g
Extrato de leveduras	5.0 g
NaCl	5.0 g
Ágar	15.0 g

O pH foi ajustado para 7.2 com NaOH ou HCl.

3.3 Conjugação

No processo de conjugação seguiu-se a metodologia descrita por WALSH *et al.*, (1984) com algumas modificações.

A cultura doadora de Escherichia coli (WR 6016 - F' T₈ 114 lac :: Tn5) foi cultivada em meio LB contendo

antibiótico kanamicina na concentração de 20 µg/ml durante à noite, à 37 °C com agitação de 180 rpm.

A cultura receptora de Xanthomonas campestris pv. campestris (Sm^R) também foi cultivada nas mesmas condições de tempo e agitação descritas acima descritas acima, porém à 28 °C, em meio LB contendo antibiótico estreptomicina (200 µg/ml).

Posteriormente, a cultura de Escherichia coli foi diluída em 100 vezes em meio LB sem antibiótico e crescida por aproximadamente 2 horas, com objetivo de se atingir a fase exponencial das células.

Após este período, 2.4 ml da cultura doadora e 0.8 ml da cultura receptora, em fase estacionária, foram misturados em um frasco erlenmeyer de 125 ml e incubados em estufa à 28 °C, sem agitação por aproximadamente 20 horas.

Passado este período de tempo, amostras da mistura foram removidas, diluídas (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) e plaqueadas em meio seletivo contendo os antibióticos estreptomicina (100 µg/ml) e kanamicina (20 µg/ml).

3.4 Digestão do probe com enzima de restrição Hind III

Para a digestão do probe com Hind III foi utilizado sistema de 15 µl. O tampão react 2, específico desta enzima, estava cinco vezes concentrado e foi adicionado 20 U (unidades) de enzima de restrição por ug de DNA. O processo de digestão durou aproximadamente 3 horas à 37 °C.

Uma alíquota da amostra digerida foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% e analisada em transiluminador.

3.5 Hibridação de colônia por "Dot Blot"

As 150 colônias a serem hibridadas foram inoculadas, pelo método de ponto, em placas de Petri com meio de cultura LB, sem antibiótico. Foram inoculadas 50 colônias por placa, sendo que os controles foram uma linhagem sem Tn5 (NRRL B-1459) e uma com Tn5 (WR6016).

Foram feitas réplicas das colônias em papel de filtro Whatman 1 pré esterilizado por autoclavagem. O papel ficou sobre as placas até ficarem molhados (aproximadamente 5 minutos) com as "digitais" das colônias, fazendo-se, de vez em quando, uma leve pressão com o cabo da pinça.

Posteriormente os papéis réplicas foram retirados e colocados, com as colônias para cima, sobre um papel de filtro embebido em solução desnaturante por 15 minutos.

Em seguida as réplicas foram transferidas para papel de filtro embebido em solução neutralizadora e mantidas neste por mais 15 minutos ou até que o pH atingisse 8.0.

Para retirar o excesso de solução, as réplicas foram colocadas sobre papel de filtro. A seguir, estas foram lavadas 3 vezes com tampão SSC (2x) por 10 minutos cada, sob leve agitação. Manteve-se por 2 horas à 80°C.

3.5.1 Pré-hibridação

Posicionou-se as réplicas em um saco plástico próprio para Southern-Blot e estas foram embebidas com 10 ml de solução de pré-hibridação. Retirou-se o excesso, as bolhas e finalmente lacrou-se o saco plástico. Este foi incubado por 2 horas à 65 °C.

O sistema de incubação para "nick-translation" consistiu de: 10.0 µl de DNA (aproximadamente 1-2 µg), 5.0 µl de tampão TM (10x), 2.5 µl de BSA (1 µg/ml), 5.0 µl de B-OH (0.1M), 5.0 µl de dNTP [-ATP(10x)], 2.0 µl de DNase (100ng/ml), 1.0 µl de DNA polimerase (10 U/µl), 1.0 µl de -ATP-³²P e 18.5 µl de água destilada e esterilizada, totalizando um volume de 50 µl.

Este sistema foi incubado por 90 minutos à 16°C.

Posteriormente, adicionou-se ao sistema 5.0 µl de tRNA (2 mg/ml), 6.0 µl de Stop Mix, 6.0 µl de SDS 1% e 20.0 µl de tampão de amostra. O sistema foi, então, aplicado em coluna de biogel e coletou-se frações de 100 µl.

3.5.2 Hibridação

Retirou-se a solução de pré-hibridação. Adicionou-se sobre as réplicas a solução de hibridação. As bolhas foram retiradas, o saco plástico foi selado e incubou-se à 65 °C durante a noite. A seguir, as réplicas foram rapidamente lavadas por 5 minutos com 250 ml de solução I de lavagem, à

temperatura ambiente. Lavou-se, sob leve agitação, por mais 2 horas à 65 °C com 250 ml de solução II de lavagem. Novamente lavou-se as réplicas, agora, com 250 ml de solução II (pré-aquecida à 65 °C) por 30 minutos à 65 °C.

Uma última lavagem foi feita à temperatura ambiente com 250 ml de solução II de lavagem.

As réplicas foram, então, postas sobre papel de filtro para secar. Deixou-se na estufa à aproximadamente 60 °C, até secar completamente.

Fixou-se as réplicas sobre uma placa de vidro e fez-se autorradiografias, expondo-as em uma chapa de raio-X.

Soluções utilizadas para hibridação ("DOT BLOT")

Lampão SSC (20x)

NaCl 17.5 %

citrato de sódio 8.8 %

pH 7.0

Solução Desnaturante

NaOH 0.5 M

NaCl 1.5 M

Solução Neutralizadora

Tris-HCl 1.0 M - pH 8.0

NaCl 1.5 M

Solução de pré-hibridação

sarcosil	1 %
tRNA	30 µg/ml
SSC (6x)	

Solução de hibridação (para 10 ml)

sonda marcada	
tRNA (2mg/ml)	50 µl
sarcosil	1.0 %
SSC (6x)	

Ferver em banho-maria o tRNA, a sonda e o sarcosil por 10 minutos. Colocar imediatamente no gelo e então adicionar SSC e água para completar o volume.

Solução I de lavagem

SSC (2x)	
sarcosil	1.0 %

Solução II de lavagem

SSC (1x)	
sarcosil	0.5 %

Soluções para "nick-translation"

a) Tampão TM:

Tris-HCl	0.5 M pH 7.5
MgCl ₂	0.05 M

b) B-mercaptoetanol B-OH 0.1 M

c) d-NTP (-ATP) 10x

dTTP 200 uM

dGTP 200 uM

dCTP 200 uM

Tris-HCl 10 mM pH 7.5

As soluções de nucleotídeos trifosfatos foram preparadas em solução levemente alcalina ou neutra por serem instáveis em pH baixo.

BSA 1 mg/ml

dissolvida em água

Stop Mix

NaCl 1 M

EDTA 100 mM

Tris-HCl 20 mM pH 8.0

Lameão amostra de coluna de Bio-gel

glicerol 50 %

EDTA 2 mM

Azul de Bromofenol 0.1 %

Tampão utilizado para digestão do DNA com a enzima
Hind III (React 2)

Tris-HCl	50 mM
MgCl ₂	10 mM
NaCl	50 mM

pH 8.0

3.6 Teste de fitopatogenicidade

3.6.1 Teste "in vitro"

Foi utilizada couve-manteiga em discos de 1.5 cm de diâmetro. Os discos foram colocados em placa de Petri com ágar 0.75 %.

Os recombinantes foram crescidos em placas de Petri, pelo método de esgotamento, por 24 horas para realização dos testes.

Os discos de couve foram mantidos em hipoclorito de sódio 10%, por 5 minutos, para esterilização, com posteriores lavagens em água destilada estéril.

A inoculação foi realizada com uma alça de platina coberta de células lesando-se superficialmente a epiderme da folha, na sua parte inferior.

3.6.2 Teste "in vivo"

Para este teste foram utilizadas sementes de couve-manteiga da marca Segil (Sementes Gimenes Ltda). As sementes foram plantadas, posteriormente transferidas para copos plásticos e quando a 2ª folha verdadeira atingiu o tamanho de aproximadamente 2.5 de largura, estas foram inoculadas pelo método descrito no teste "in vitro".

3.7 Fermentação dos recombinantes

O teste de fermentação dos recombinantes consistiu de um pré-inóculo crescido em 2 ml de meio YM com os antibióticos kanamicina à concentração de 10 ug/ml e estreptomicina à 50 ug/ml, à 28 °C, 180 rpm, por um período de aproximadamente 18 horas.

Posteriormente, este pré-inóculo foi acrescido à 20 ml de meio de produção I (MPI) e incubado nas mesmas condições de temperatura e agitação descritas acima, porém por 72 horas.

Após este período a viscosidade do caldo de fermentação foi medida em viscosímetro da marca Brookfield modelo RV, utilizando-se spindle 21 e rotações de 5, 20, 50 e 100 rpm.

3.8 Extração de plasmídios em grande escala (BIRNBOIM e DOLY, 1980 - modificada)

As células de Escherichia coli, contendo o probe do Tn5, foram crescidas em 10 ml de meio de cultura LB, contendo antibiótico ampicilina (100 µg/ml), por período aproximado de 18 horas e sob agitação à 37 °C.

Posteriormente, 5 ml desta cultura foi adicionado em 200 ml de meio LB, contendo antibiótico, e incubado à 37 °C, 180 rpm por 18 horas.

Após este período, a cultura foi centrifugada à 5000 g por 10 minutos em centrífuga da marca Beckman.

Lavou-se o sedimento com 10 ml de salina 0.9 % e centrifugou-se novamente à 5000 g por 10 minutos.

O sedimento foi ressuspendido em 2.5 ml da solução I e agitou-se vigorosamente em agitador Vortex. Posteriormente adicionou-se 2.5 ml da solução I acrescida de lisozima na concentração de 4 mg/ml. Incubou-se por 30 minutos no gelo.

Adicionou-se, então, 10 ml da solução II e o tubo foi invertido, suavemente, por 7 vezes. Incubou-se novamente por 10 minutos à 0 °C.

Posteriormente foi adicionado 7.5 ml da solução III, misturando-se muito bem, porém suavemente e incubou-se por mais 40 minutos à 0 °C.

Centrifugou-se o preparado à 12000 g por 15 minutos à 4 °C.

Foi adicionado, então, ao sobrenadante igual volume de isopropanol e deixou-se à temperatura ambiente por 5 minutos.

O material foi centrifugado à 12000g por 20 minutos à 4 °C e o sedimento foi secado à vácuo.

Este sedimento foi ressuspendido em 3 ml de tampão TE e acrescentou-se 30 µl de RNase A. Deixou-se à temperatura ambiente por 30 minutos.

A seguir, foram adicionados 1.5 ml de solução PEG 6000-30% e incubou-se no gelo por mais 30 minutos.

O material foi centrifugado à 12000 g por 20 minutos à 4 °C e o sedimento foi redissolvido em 1.0 ml de tampão TE. Em seguida adicionou-se 50 µl de acetato de sódio 2 M (pH 7.5) e 50 µl de sarcosil 10 %. Agitou-se e a mistura foi transferida para dois tubos Eppendorf.

Posteriormente adicionou-se igual volume de clorofane, agitou-se e centrifugou-se à 12000 g por 5 minutos.

Ajustou-se a concentração final de acetato de sódio para 300 mM com acetato de sódio 2 M (pH 7.5). Adicionou-se 2.5 vezes de volume de etanol 100 % e deixou-se precipitar durante à noite.

O sedimento foi coletado por centrifugação à 12000 g por 15 minutos à 4 °C e posteriormente este foi lavado com etanol 70 % à -20 °C, sem ressuspender e centrifugando-se novamente à 12000 g por 2 minutos.

O material foi secado à vácuo, ressuspendido em 100 µl de tampão R e estocado em alíquotas à -20 °C.

Foi adicionado às amostras de material tampão de amostra TA (3x) e estas foram aplicadas em gel de agarose 0.7 %. Foi utilizada uma amperagem inicial de 20 mA a fim de que as amostras penetrassem no gel e posteriormente esta foi aumentada para 40 mA. O gel foi corado com 1.0 µg/ml de brometo de etídeo dissolvido em tampão TEB (1x) por 20 minutos. A análise deste foi feita sob luz ultravioleta utilizando-se transiluminador.

3.9 Extração de plasmídios em pequena escala (BIRNBOIM e DOLY, 1980, modificado)

As culturas de Escherichia coli contendo o Tn5 foram crescidas em 3 ml de meio LB contendo antibiótico kanamicina à 10 µg/ml, à 37 °C, 180 rpm por aproximadamente 18 horas. As culturas dos recombinantes de Xanthomonas campestris foram crescidas em meio YM com os antibióticos kanamicina (10 µg/ml) e estreptomicina (50 µg/ml) e incubadas à 28 °C, nas mesmas condições descritas acima.

Centrifugou-se 1.5 ml das culturas por 15 segundos à 12000g em micro centrífuga da marca Spin I - Incibrás.

As células de Xanthomonas campestris foram lavadas 2 vezes com solução salina 0.9 % para remoção da goma.

O sedimento foi ressuspendido em 100 µl de solução I e mantido em banho de gelo por 30 minutos.

A seguir, adicionou-se 200 µl de solução II, inverteu-se lentamente o tubo para misturar e o preparado foi mantido no gelo por 5 minutos.

Posteriormente adicionou-se 150 µl de solução III. O preparado foi novamente mantido no gelo por 40 minutos.

Centrifugou-se à 12000 g por 5 minutos e recuperou-se o sobrenadante. Adicionou-se a este o dobro de volume de etanol 100 % da marca Merck, misturou-se lentamente e incubou-se no freezer durante à noite.

A seguir, centrifugou-se a 12000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi retirado rapidamente e o sedimento foi ressuspendido em 30 µl de tampão TE.

Às amostras foi adicionado tampão amostra TA (3x) e a seguir estas foram aplicadas em gel de agarose 0.7 %.

Soluções utilizadas nas extrações plasmidiais

Solução I

lisozima	4 mg/ml
Tris-HCl	25 mM
Na ₂ EDTA	10 mM
glicose	50 mM

pH 8.0

Solução II

NaOH	0.2 N
SDS	1 %

Solução III

Acetato de sódio	3.0 M
------------------	-------

Ácido acético	2.0 M
---------------	-------

pH 4.8

Solução de PEG

PEG 6000	30 %
----------	------

NaCl	1.5 M
------	-------

Clorofane

Fenol-clorofórmio	(1v/1v)
-------------------	---------

8-hidroxiquinolina	0.05 % (p/v)
--------------------	--------------

solução saturada:

Tris-HCl	20 mM pH 8.0
----------	--------------

NaCl	100 mM
------	--------

EDTA	1 mM
------	------

Solução de RNase A:

RNase A	10 mg/ml
---------	----------

Dissolvida em:

Acetato de sódio	50 mM pH 4.8
------------------	--------------

(Ferver em banho-maria por 10 minutos)

Lameão IE

Tris-HCl	25 mM
----------	-------

EDTA	10 mM
------	-------

pH 8.0

Lampão R

Tris-HCl	20 mM
EDTA	0.1 mM

pH 7.5

Soluções utilizadas nas eletroforeses em gel de agarose

Lampão de eletroforese TEB (10x)

Tris-Base	108 g/l
Ácido bórico	55 g/l
EDTA	20 mM

pH 8.4

Lampão de amostra TA(3x)

TEB (3x)

Ficol tipo 400	20 %
Azul de bromofenol	0.1 %

3.10 Precipitação da goma

Para se avaliar a qualidade da goma produzida pelos recombinantes foram realizados testes de viscosidade à várias temperaturas e pHs. Foram feitas novas fermentações dos cinco melhores recombinantes, parental Sm^R e para cada um utilizaram-se cinco repetições.

Após as leituras de viscosidade dos caldos de fermentação, a goma foi precipitada a partir da adição de

álcool comercial, sendo que as repetições foram misturadas, totalizando 100 ml.

A goma foi recuperada com o auxílio de uma bagueta de vidro, colocada numa placa de Petri e mantida em estufa à 37 °C, até secar completamente.

A seguir, esta foi triturada em almofariz e foram feitas soluções a 1% da goma de cada uma das linhagens.

A goma xantana Keltrol da marca Kelco (U.S.A.) foi utilizada como padrão, uma vez que esta já é comercializada como espessante em alimentos.

3.10.1 Teste de viscosidade à várias temperaturas

A partir da solução 1 % da goma de cada uma das linhagens, a viscosidade foi medida às temperaturas de 100°C, 75°C, 50°C e 30°C. As soluções foram mantidas em banho-maria da marca ética por 15 minutos na temperatura desejada para posterior leitura.

3.10.2 Teste de viscosidade à vários pHs

A viscosidade das linhagens foi medida em pH 1.0, pH 11.0 e pH normal da solução.

O pH 1.0 foi acertado com HCl 6 N e HCl 1 %.

O pH 11.0 foi acertado com NaOH 6 N e NaOH 0.5 N.

4. Resultados

4.1 Transferência do Tn5 para Xanthomonas campestris pv. campestris

A linhagem de Escherichia coli WR 6016 - F[']_{ts114} lac::Tn5 foi mantida com o mutante Sm^R de Xanthomonas campestris NRRL B-1459 por um período de aproximadamente 20 horas. Foram isolados 581 recombinantes em meio de cultura YM contendo os antibióticos kanamicina e estreptomicina. Foram realizados dois experimentos de conjugação e a frequência de transposição variou de 2.5 à 3.0 x 10⁻⁵ por célula receptora.

Foi realizada uma análise eletroforética, em gel de agarose, de 50 recombinantes e parentais e somente a linhagem de E. coli contendo o Tn5, apresentou banda plasmidial, indicando, assim, um possível comportamento suicida deste plasmídeo em Xanthomonas campestris pv. campestris.

Os recombinantes isolados foram numerados de 1 à 581. A fim de se comprovar que a marca km^R era devido à inserção do Tn5, foi realizado um teste para se verificar a taxa de mutação espontânea. Aproximadamente 11 x 10⁸ células da linhagem receptora Sm^R foram semeadas em meio de cultura contendo os antibióticos kanamicina e estreptomicina e não foi detectado nenhum mutante espontâneo Km^R e Sm^R.

linhagens testadas que mostraram-se patogênicas no teste "in vitro" também o foram no teste "in vivo". Sendo assim, a metodologia adotada foi a "in vitro" devido à facilidade de execução com grande número de linhagens e ao tempo de aparecimento dos sintomas da doença (no teste "in vivo" os sintomas aparecem em 7 ou 10 dias e no teste "in vitro", em apenas 3 ou 4 dias). As linhagens consideradas não patogênicas neste primeiro teste foram posteriormente testadas "in vivo" para maior consistência dos dados.

Discos de folha de couve tipo manteiga foram inoculados com os recombinantes e os sintomas puderam ser analisados num período de três (3) a quatro (4) dias. Inicialmente a área inoculada apresentou um processo de clorose e posteriormente necrose.

Foram utilizadas oito (8) repetições para cada linhagem e na análise dos dados foi adotado o critério de que se dentre as oito repetições, pelo menos uma resultasse em resposta positiva, com todos os sintomas característicos, a linhagem seria considerada patogênica. Dos 581 recombinantes testados, 41 mostraram-se não patogênicos no teste "in vitro". Estes mutantes foram testados "in vivo", com 3 repetições e 28 destes resultaram em resposta positiva. Portanto no teste de fitopatogenicidade a frequência de mutantes não patogênicos, confirmados na planta, foi de 2.06%.

No decorrer do experimento foi observado, ainda, uma certa alteração dos sintomas nos discos de couve. Algumas

linhagens não resultaram no sintoma característico de necrose e somente um halo de coloração verde, mais intenso que o verde da folha, foi observado no ponto de inoculação. Estas linhagens quando testadas "in vivo" resultaram em doença somente após um período de tempo muito maior que o normal.

linhagens não resultaram no sintoma característico de necrose e somente um halo de coloração verde, mais intenso que o verde da folha, foi observado no ponto de inoculação. Estas linhagens quando testadas "in vivo" resultaram em doença somente após um período de tempo muito maior que o normal.



FIGURA 1: Teste de fitopatogenicidade "in vitro"
à esquerda - controle; centro - halo verde; à direita
halo de necrose característico da doença



FIGURA 2: Teste de fitopatogenicidade "in vivo"
à esquerda - recombinante com Tn5; centro - controle;
à direita - recombinante com Tn5

4.5 Seleção de mutantes para maior viscosidade

Para avaliar o aumento de viscosidade, foram selecionados 90 recombinantes escolhidos apenas pela viscosidade aparente apresentada por colônias isoladas destes.

Estas linhagens foram divididas em seis experimentos e para cada uma delas foram utilizadas 3 repetições.

A leitura de viscosidade das linhagens fermentadas foi realizada em viscosímetro em 2 rotações: 20 rpm e 100 rpm.

Os dados apresentados são referentes às medições efetuadas em rotação de 20 rpm, utilizando-se spindle 21 (TABELAS 1,2,3,4,5, e 6), uma vez que testes preliminares mostraram que o decréscimo de viscosidade de 20 rpm para 100 rpm é sempre proporcional.

Os valores referentes às medições efetuadas em 100 rpm encontram-se nos Apêndices 12, 13, 14, 15, 16 e 17.

TABELA 1: Viscosidade dos recombinantes contendo Tn5
(em CPS) à 20 rpm - Experimento 1

linhagens	1ª	2ª	3ª	média
Sm ^B	862.5	875.0	750.0	829.17
08	200.0	212.5	250.0	220.84
09	337.5	375.0	337.5	350.00
18	725.0	650.0	600.0	658.34
23	375.0	425.0	412.5	404.17
28	375.0	350.0	300.0	341.67
48	737.5	750.0	775.0	754.17
55	762.5	612.5	675.0	683.34
71	750.0	675.0	575.0	666.67
75	412.5	425.0	425.0	420.84
98	412.5	525.0	500.0	479.17
101	187.5	150.0	175.0	170.84
105	587.5	350.0	375.0	437.50
117	550.0	500.0	637.5	545.84
118	525.0	575.0	725.0	608.34
119	412.5	350.0	275.0	345.84
125	37.5	50.0	62.5	50.00
137	87.5	100.0	75.0	87.50
143	300.0	312.5	437.5	350.00
150	250.0	325.0	212.5	262.50
159	550.0	500.0	500.0	516.67
165	187.5	125.0	487.5	266.67
169	525.0	687.5	550.0	587.50

TABELA 2: Viscosidade dos recombinantes contendo Tn5
(em CPS) à 20 rpm - experimento 2

linhagens	Repetições			
	1ª	2ª	3ª	média
Sm ^R	450.0	575.0	500.0	508.34
02	550.0	537.5	500.0	529.17
80	175.0	175.0	150.0	166.67
91	75.0	62.5	75.0	70.84
138	350.0	312.5	300.0	320.84
228	837.5	837.5	712.5	795.84
231	50.0	37.5	25.0	37.50
282	462.5	425.0	550.0	479.17
283	25.0	37.5	12.5	25.00
307	300.0	262.5	150.0	237.50
309	150.0	150.0	450.0	250.00

TABELA 3: Valores de viscosidade dos recombinantes contendo
Tn5 (em CPS) à 20 rpm - experimento 3

linhagens	Repetições			
	1ª	2ª	3ª	média
Sm ^R	325.0	362.5	337.5	341.67
301	350.0	350.0	400.0	366.67
302	775.0	850.0	887.5	837.50
306	525.0	450.0	400.0	458.34
312	537.5	675.0	525.0	579.17
314	275.0	425.0	650.0	450.00
317	837.5	650.0	637.5	708.34
329	750.0	700.0	625.0	691.67
338	600.0	762.5	550.0	637.50
357	712.5	587.5	612.5	637.50

TABELA 4: Valores de viscosidade dos recombinantes contendo
Tn5 (em CPS) à 20 rpm - experimento 4

linhagens	Repetições			média
	1ª	2ª	3ª	
Sm ^R	450.0	450.0	450.0	450.0
366	250.0	225.0	287.5	254.17
377	425.0	412.5	437.5	425.00
379	325.0	312.5	325.0	320.84
382	325.0	362.5	387.5	358.34
383	175.0	162.5	187.5	175.00
384	512.5	412.5	375.0	433.34
385	150.0	175.0	87.5	137.50
397	337.5	500.0	350.0	395.84
399	262.5	137.5	37.5	145.84
401	412.5	287.5	225.0	308.34
420	650.0	675.0	700.0	675.00

TABELA 5: Valores de viscosidade dos recombinantes contendo
Tn5 (em CPS) à 20 rpm - Experimento 5

linhagens	Repetições			
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	média
Sm ^R	612.5	650.0	587.5	616.67
336	425.0	450.0	500.0	458.34
405	287.5	378.0	250.0	305.17
419	125.0	187.5	125.0	145.84
432	887.5	1037.5	912.5	945.84
434	975.0	975.0	887.5	945.84
438	725.0	275.0	462.5	487.50
464	662.5	662.5	575.0	633.34
472	587.5	1012.5	575.0	725.00
478	250.0	187.5	212.5	216.67
479	300.0	362.5	300.0	320.84

TABELA 6: Valores de viscosidade dos recombinantes contendo
Tn5 (em CPS) à 20 rpm, Experimento 6

linhagens	1 ^a	2 ^a	3 ^a	média
Sm ^R	337.5	375.0	335.0	349.17
481	550.0	500.0	537.5	529.17
486	212.5	200.0	262.5	225.00
487	712.5	637.5	600.0	650.00
490	637.5	550.0	587.5	591.67
493	575.0	587.5	637.5	600.00
495	812.5	787.5	825.0	808.34
496	925.0	925.00	962.5	937.50
501	850.0	887.5	850.0	862.50
510	700.0	625.0	562.5	629.17
511	675.0	537.5	550.0	587.50
512	500.0	537.5	500.0	512.50
513	462.5	425.0	462.5	450.00
514	450.0	462.5	475.0	462.50
515	462.5	537.5	525.0	508.34
522	662.5	750.0	837.5	750.00
526	1037.5	962.5	912.5	970.84
542	450.0	462.5	412.5	441.67
554	637.5	600.0	612.5	616.67
565	375.0	400.0	450.0	408.34
139	762.5	825.0	887.5	825.00
159	512.5	475.0	537.5	508.34
179	712.5	687.5	575.0	658.34
189	700.0	825.0	900.0	808.34

TABELA 6: Valores de viscosidade dos recombinantes contendo
Tn5 em (CPS) à 20 rpm - Experimento 6 (continuação)

linhagens	1 ^a	2 ^a	3 ^a	$\bar{x}$
190	212.5	187.5	212.5	204.17
228	787.5	925.0	875.0	862.50
537	662.5	650.0	600.0	637.50
282	712.5	712.5	725.0	716.67
362	700.0	687.5	712.5	700.00
34	512.5	537.5	512.5	520.84

A partir destes dados, foi aplicada análise de variância e em todos os experimentos o valor de F, ao nível de 5% de significância, foi altamente significativo, indicando assim, que existe, pelo menos, uma média diferente entre eles (Apêndices 1, 2, 3, 4, 5 e 6).

Posteriormente aplicou-se o teste de TUKEY. A TABELA 7, referente ao experimento 1, mostra que nenhum recombinante apresentou uma média superior ao parental Sm^R. Entretanto as linhagens Sm^R, 48, 55, 71, 18 e 118 não apresentaram diferenças significativas entre si.

A TABELA 8 apresenta os dados do experimento 2 e podemos observar que o recombinante 228 se destacou do restante, apresentando a melhor média, inclusive quando comparado com o parental Sm^R.

Na TABELA 9, referente ao experimento 3, encontramos apenas a linhagem 302 que se destacou nitidamente. Os recombinantes 317, 320, 338, 357 e 312 não apresentaram diferenças significativas com relação ao 302, foram superiores à Sm^R porém participaram de um outro grupo de recombinantes.

A TABELA 10 ilustra os dados do experimento 4 e somente o recombinante 420 apresentou a melhor média em relação ao parental e aos demais.

Os dados do experimento 5 estão na TABELA 11. Podemos observar que os recombinantes 432, 434, 472 e 464 não apresentaram diferenças significativas entre si, apresentando valores superiores à Sm^R. Contudo os

recombinantes 432 e 434 foram os que apresentaram as melhores médias dos valores de viscosidade.

Por último, temos a TABELA 12 que ilustra os dados do experimento 6. Não houve diferenças significativas entre os recombinantes 526, 496, 501, 228, 139, 189, 495 e todos apresentaram valores superiores ao parental, contudo os melhores resultados foram dos recombinantes 526 e 496.

Para as análises de viscosidade à várias rotações, temperaturas e pHs foram selecionados cinco recombinantes que apresentaram os melhores valores de viscosidade. Devido ao fato do parental Sm^R ter apresentado valores de viscosidade variados, foram selecionados apenas os recombinantes que apresentaram os melhores valores de viscosidade, ou seja, os que se destacaram nitidamente dentro de cada experimento. Assim, nenhum recombinante foi selecionado no experimento 1, uma vez que a linhagem que se destacou foi a Sm^R, no experimento 2 a linhagem selecionada foi a 228, no experimento 3 a linhagem seria a 302 porém esta foi perdida no decorrer dos experimentos. Isto também ocorreu no experimento 4 com a linhagem 420. No experimento 5 as linhagens selecionadas foram 432 e 434 e no experimento 6, a 526 e 501. A linhagem 496 não foi selecionada porque esta também foi perdida durante as sucessivas repicagens. Portanto os recombinantes selecionados foram: 228, 432, 434, 501 e 526.

TABELA 7: Teste de TUKEY para as médias de viscosidade dos recombinantes com Tn5 - experimento 1

linhagens	médias	
Sm ^R	829.17	a
48	754.17	a b
55	683.34	a b c
71	666.67	a b c d
18	658.34	a b c d
118	608.34	a b c d e
169	587.50	b c d e
117	545.84	b c d e f
159	516.67	c d e f
98	479.17	c d e f g
105	437.50	d e f g h
75	420.83	e f g h
23	404.17	e f g h
09	350.00	f g h i
143	350.00	f g h i
119	345.84	f g h i
28	341.67	f g h i
165	266.67	g h i j
150	262.50	g h i j
08	220.83	h i j
101	170.84	i j
137	87.50	j
125	50.00	j

TABELA 8: Teste de TUKEY para os valores de viscosidade dos
recombinantes com Tn5 - Experimento 2

linhagens	médias	
228	795.83	a
02	529.17	b
Sm ^B	508.34	b c
282	479.16	b c
138	320.84	c d
309	250.00	d e
307	237.50	d e
80	166.67	d e f
91	70.84	e f
231	37.50	f
283	25.00	f

obs: As letras indicam grupos dentro dos quais não há
diferenças significativas entre as linhagens,
ao nível de 5% de significância

TABELA 9: Teste de TUKEY para os valores de viscosidade dos
recombinantes com Tn5 - Experimento 3

linhagens	médias	
302	837.50	a
317	708.34	a b
320	691.67	a b
338	637.50	a b
357	637.50	a b
312	579.17	a b c
306	458.34	b c
314	450.00	b c
301	366.67	c
Sm ^{RA}	341.67	c

obs: As letras indicam grupos dentro dos quais não há
diferenças significativas entre as linhagens,
ao nível de 5% de significância.

TABELA 10: Teste de TUKEY para os valores de viscosidade dos recombinaentes com Tn5 - experimento 4

linhagens	médias	
420	675.00	a
Sm ^B	450.00	b
384	433.34	b
377	425.00	b
397	395.84	b c
382	358.84	b c
379	320.84	b c d
401	308.34	b c d e
336	254.17	c d e f
383	175.00	d e f
399	145.84	e f
385	137.50	f

obs: As letras indicam grupos dentro dos quais não há diferença significativa entre as linhagens, ao nível de 5% de significância.

TABELA 11: Teste de TUKEY para os valores de viscosidade dos recombinantes com Tn5 - Experimento 5

linhagens	médias	
432	945.84	a
434	945.84	a
472	725.00	a b
464	633.34	a b c
Sm ^B	616.17	b c d
438	487.50	b c d e
336	458.34	b c d e f
479	320.84	c d e f
405	305.17	d e f
478	216.67	e f
419	145.84	f

Obs: As letras indicam grupos dentro dos quais não há diferença significativas entre as linhagens, ao nível de 5% de significância.

TABELA 12: Teste de TUKEY para os valores de viscosidade dos
recombinantes com Tn5 - Experimento 6

linhagens	médias	
526	970.00	a
496	937.50	a
501	862.50	a b
228	862.50	a b
139	825.00	a b c
189	808.34	a b c d
495	808.34	a b c d
522	750.00	b c d e
282	716.67	b c d e
362	700.00	b c d e
179	658.34	c d e f
487	650.00	d e f
537	637.50	e f
510	629.17	e f g
554	616.67	e f g h
493	600.00	e f g h i
490	591.67	e f g h i
511	587.50	e f g h i
481	529.17	f g h i j
34	520.84	f g h i j
512	512.50	f g h i j k
159	508.34	f g h i j k
515	508.34	f g h i j k
514	462.50	g h i j k

TABELA 12 : Teste de TUKEY para os valores de viscosidade
dos recombinantes com Tn5 - Experimento 6
Continuação

linhagens	médias	
513	450.00	h i i k
542	441.67	i j k
565	408.34	j k
Sm ^B	349.17	k l
486	225.00	l
190	204.17	l

Obs: As letras indicam grupos dentro dos quais não há
diferença significativas entre as linhagens,
ao nível de 5% de significância.

4.5.1 Análise dos recombinantes quanto à viscosidade

Os cinco recombinantes selecionados, 228, 432, 434, 501 e 526, e o parental Sm[™] foram inoculados em meio MPI e após fermentação as gomas foram precipitadas com etanol e secas em estufa. O peso seco da goma obtida de cada linhagem foi de aproximadamente 1 grama a partir de 100 ml de caldo de fermentação (Apêndice 7). Uma solução de 1% da goma de cada uma das linhagens foi submetida à rotações de 5, 20, 50 e 100 rpm do viscosímetro e a viscosidade foi medida à temperatura ambiente.

A goma xantana, comercial, Keltrol foi utilizada como goma padrão para comparação com as demais gomas obtidas.

Na análise dos dados foi aplicado o teste não paramétrico de FRIEDMAN, uma vez que não foi observado homogeneidade entre as variâncias.

A TABELA 13 ilustra os valores de viscosidade obtidos. O resultado altamente significativo do teste de FRIEDMAN de 22,39 indica que há diferenças significativas entre as linhagens.

Na TABELA 13a podemos observar que a goma padrão apresentou os melhores valores de viscosidade. Entretanto, de acordo com a TABELA 13 podemos observar que as linhagens 432 e 434 apresentaram valores muito semelhantes à esta.

Quando comparamos os recombinantes em relação ao parental Sm[™] podemos observar que todos são superiores a

este e que os recombinantes 432 e 434 apresentaram valores muito superiores.

Graficamente estes dados resultam numa função inversa do tipo $Y = a/x^K$, onde $Y = \text{CPS}$, $x = \text{número de rotações}$ e a e K , parâmetros a determinar. Portanto foi feita a conversão dos dados para logarítimo a fim de se observar o comportamento dos recombinantes, em relação à goma padrão, através de retas (TABELA 13b, GRÁFICO 1).

Foi realizado um teste de paralelismo entre as retas e observou-se que as linhagens Sm^R , 228, 501 e 526 não apresentaram diferenças significativas, ao nível de 5% de significância, quando comparadas com o padrão, ou seja, seus comportamentos às várias rotações foram semelhantes ao apresentado pela goma Keltrol. Já os recombinantes 432 e 434 apresentaram diferenças significativas quando comparados com esta, ou seja, embora estas duas linhagens tenham apresentado valores um pouco superiores ao padrão nas rotações de 5 e 20 rpm, estes decresceram em 50 e 100 rpm, indicando, assim, que os recombinantes não foram tão estáveis, às várias rotações, quanto a goma padrão (Apêndice 8).

TABELA 13: Valores de viscosidade da goma das linhagens,
em CPS, à várias rotações

linh	rotações				SOC
	5	20	50	100	
Sm ^B	1900.00(1)	600.00(1)	280.00(1)	168.75(1)	4
434	3525.00(6)	943.75(5)	412.50(5)	238.75(6)	22
228	2375.00(3)	775.00(3)	350.00(4)	190.00(3)	13
526	2475.00(4)	787.50(4)	342.50(3)	208.75(4)	15
432	3625.00(7)	1025.00(6)	450.00(6)	233.75(5)	24
501	2150.00(2)	662.50(2)	320.00(2)	186.25(2)	8
padrão	3250.00(5)	1012.50(7)	487.50(7)	323.75(7)	26

$$X^B_r = 22.39 ***$$

obs: Os valores apresentados são médias de 2 repetições.

Os números de 1 a 7 indicam a ordem crescente das
médias

A coluna SOC indica a soma da ordem crescente das
médias

TABELA 13a: Teste de FRIEDMAN para os valores de viscosidade
à várias rotações

$$\Delta = 14$$

linhagens	valores	
Padrão	26	a
432	24	a
434	22	a b
526	15	a b c
228	13	a b c
501	08	b c
Sm ^R	04	c

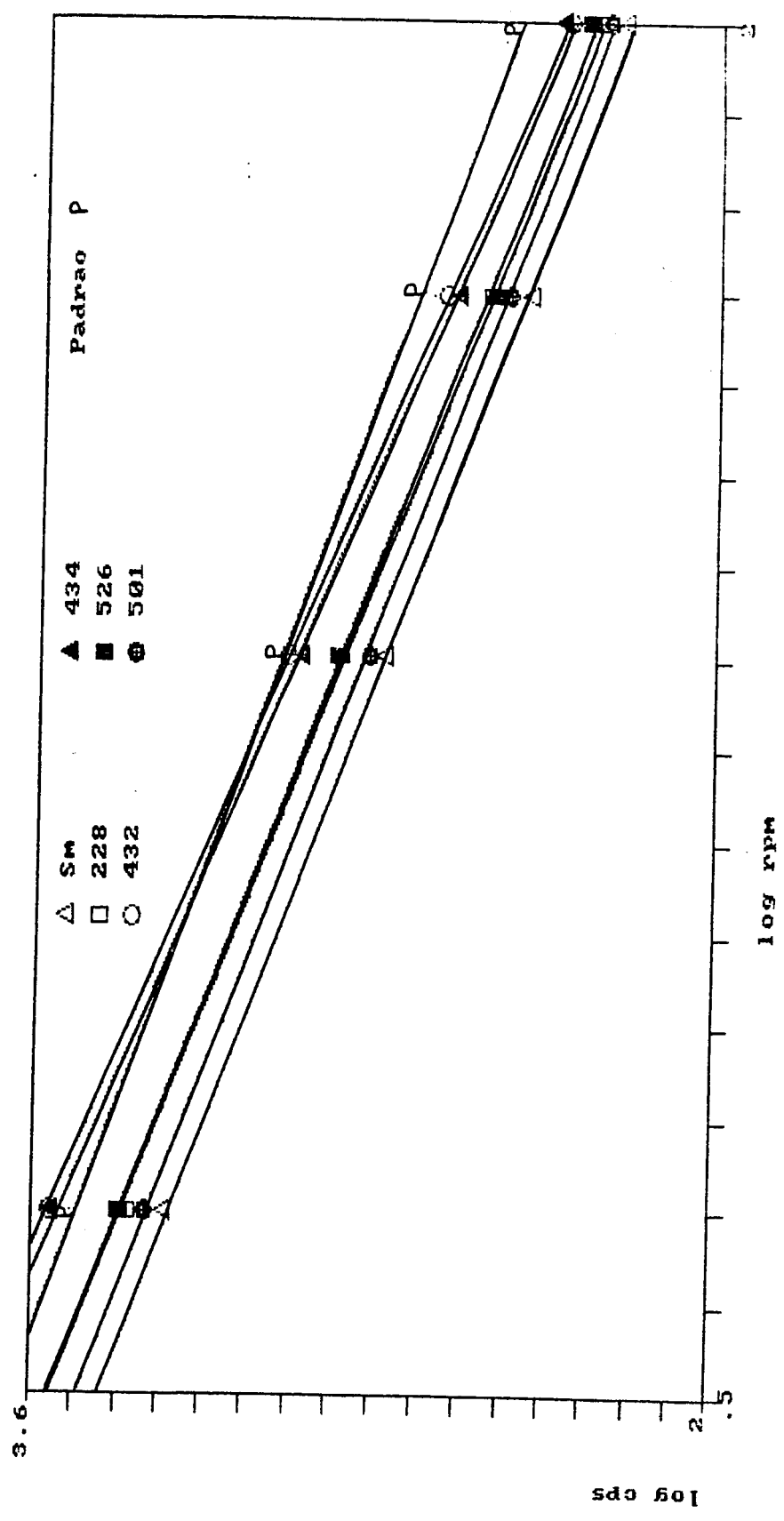
obs: A 2ª coluna (valores) indica a soma dos valores da
ordem crescente das médias.

As letras indicam grupos dentro dos quais não há
diferenças significativas entre as linhagens, ao
nível de 5% de significância.

TABELA 13b: Valores de viscosidade convertidos em valores
logarítmicos

linhagem	log rpm			
	0.699	1.301	1.699	2.000
Sm ^R	3.279	2.778	2.447	2.227
434	3.547	2.975	2.615	2.378
228	3.376	2.889	2.544	2.279
526	3.393	2.896	2.535	2.320
432	3.559	3.010	2.653	2.369
501	3.332	2.821	2.505	2.270
padrão	3.512	3.005	2.688	2.510

GRÁFICO 1. Valores de viscosidade, em log, das gomas à várias rotações.



4.5.2 Análise de viscosidade à várias temperaturas

Uma solução 1% da goma de cada uma das linhagens de recombinantes, paternal e padrão foi submetida às temperaturas de 100°C, 75°C, 50°C e 30°C por aproximadamente 15 minutos e posteriormente foi medida a viscosidade à 100 rpm.

A avaliação dos resultados foi feita através do teste de FRIEDMAN e o resultado foi altamente significativo (21,75), indicando assim, que existem diferenças significativas entre as linhagens (TABELA 14).

Pela TABELA 14a podemos observar que o recombinante 432 apresentou os melhores valores de viscosidade em relação à Sm[®]. Quando comparado com a goma padrão, este apresentou, porém, resultados inferiores.

Analisando a TABELA 14b e o GRÁFICO 2, que representam os valores de viscosidade linearizados, podemos perceber que todas as linhagens apresentaram valores inferiores ao padrão.

O teste de paralelismo revelou que não existem diferenças significativas entre as retas, ou seja, embora a Sm[®] e os recombinantes tenham apresentado valores inferiores à goma padrão, eles se comportaram muito semelhantemente à esta (Apêndice 9).

TABELA 14: Valores de viscosidade da goma das linhagens,
em CPS, à várias temperaturas à
100 rpm

linhagem	temperatura (°C)				
	100	75	50	30	SOC
Sm ^B	61.67(1)	78.34(1)	91.67(1)	120.00(1)	4
434	85.00(5)	90.00(4)	103.34(2)	133.34(3)	14
228	73.34(2)	86.67(2)	105.84(3)	126.67(2)	9
526	78.34(3)	98.34(5)	116.67(4)	147.50(5)	17
432	101.67(6)	111.67(6)	135.00(6)	160.84(6)	24
501	82.50(4)	89.17(3)	120.00(5)	140.84(4)	16
padrão	207.50(7)	250.00(7)	271.66(7)	325.83(7)	28

$$X_{\bar{r}} = 21.75 \text{ ***}$$

Obs: Os valores apresentados são médias de 3 repetições.

Os números de 1 a 7 indicam a ordem crescente das médias.

A coluna SOC indica a soma da ordem crescente das médias.

TABELA 14a: Teste de FRIEDMAN para os valores de viscosidade
à várias temperaturas

$$\Delta = 14$$

linhagens	valores	
padrão	28	a
432	24	a
526	17	a b
501	16	a b
434	14	a b
228	09	b
Sm ^R	04	b

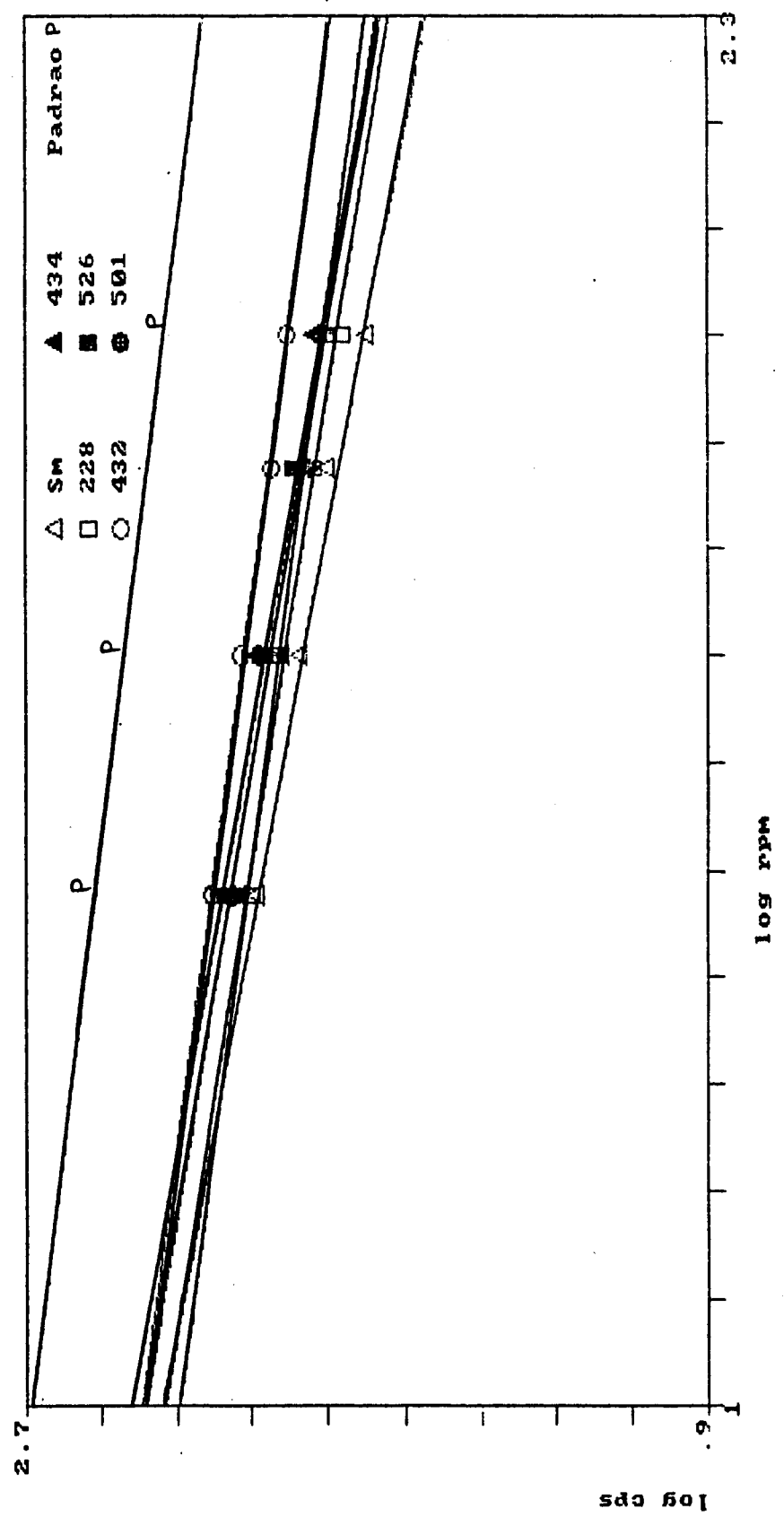
obs: A 2ª coluna (valores) indica a soma dos valores da ordem crescente das médias.

As letras indicam grupos dentro dos quais não há diferenças significativas entre as linhagens, ao nível de 5% de significância.

TABELA 14b: Valores de viscosidade convertidos em valores logarítmicos

linhagem	log °C			
	2.000	1.875	1.699	1.477
Sm ⁸⁰	1.790	1.894	1.962	2.079
434	1.929	1.954	2.014	2.125
228	1.865	1.938	2.025	2.103
526	1.894	1.993	2.067	2.169
432	2.007	2.048	2.130	2.206
501	1.916	1.950	2.079	2.149
padrão	2.317	2.398	2.434	2.513

GRÁFICO 2. Valores de viscosidade, em log, das gomas à várias temperaturas.



4.5.3 Análise de viscosidade á vários pHs

Para esta análise foram seleccionados os pHs 1.0, 6.5 e 11.0. Foi verificado que nas soluções à 1%, compostas apenas por água destilada e goma, sem qualquer adição de soluções ácidas ou alcalinas, o pH é de aproximadamente 6.5. Portanto os dados dos valores de viscosidade a este pH encontram-se nas TABELAS 13, 13a, 13b e GRÁFICO 1.

4.5.4 Análise de viscosidade a pH 1.0

A TABELA 15 apresenta os valores de viscosidade das linhagens em solução de pH 1.0 e o resultado altamente significativo do teste de FRIEDMAN (23,01).

Pela TABELA 15a podemos observar que os melhores resultados foram obtidos pela goma padrão e que o recombinante 432, embora tendo apresentado valores muito inferiores, comportou-se semelhantemente à esta. Os recombinantes 228 e 432 foram os que apresentaram os maiores valores de viscosidade quando comparados ao parental Sm^R.

O GRÁFICO 3 e a TABELA 15b ilustram as viscosidades, em logarítmo, dos recombinantes em pH 1.0 e podemos observar que todas as linhagens, exceto a goma padrão, tiveram a sua viscosidade diminuída em pH ácido.

O teste de paralelismo revelou que todas as linhagens testadas contra a goma padrão apresentaram diferenças significativas, ou seja, elas não possuem comportamentos semelhantes á esta em pH de extrema acidez (Apêndice 10).

TABELA 15: Valores de viscosidade da goma das linhagens,
em CPS, a pH 1.0

linh	rot				
	5	20	50	100	SOC
Sm ⁸	825.00(4)	337.50(3.5)	180.00(3)	127.50(3)	13.5
434	800.00(3)	306.25(2)	147.50(2)	91.25(2)	9
228	1150.00(5)	431.25(5)	257.50(5)	156.25(5)	20
526	700.00(2)	337.50(3.5)	190.00(4)	135.00(4)	13.5
432	1200.00(6)	475.00(6)	305.00(6)	161.25(6)	24
501	500.00(1)	231.25(1)	127.50(1)	86.25(1)	4
padrão	4450.00(7)	1350.00(7)	572.50(7)	298.75(7)	28

$$X_{\text{m}}^{\text{m}} = 23.01 \text{ ***}$$

Obs: Os valores apresentados são médias de 2 repetições

Os números de 1 a 7 indicam a ordem crescente das
médias

A coluna SOC indica a soma da ordem crescente das
médias.

TABELA 15a: Teste de FRIEDMAN para os valores de viscosidade
a pH 1.0

$$\Delta = 14$$

linhagem	valores	
padrão	28	a
432	24	a b
228	20	a b c
526	13.5	b c d
Sm [®]	13.5	b c d
434	09	c d
501	04	d

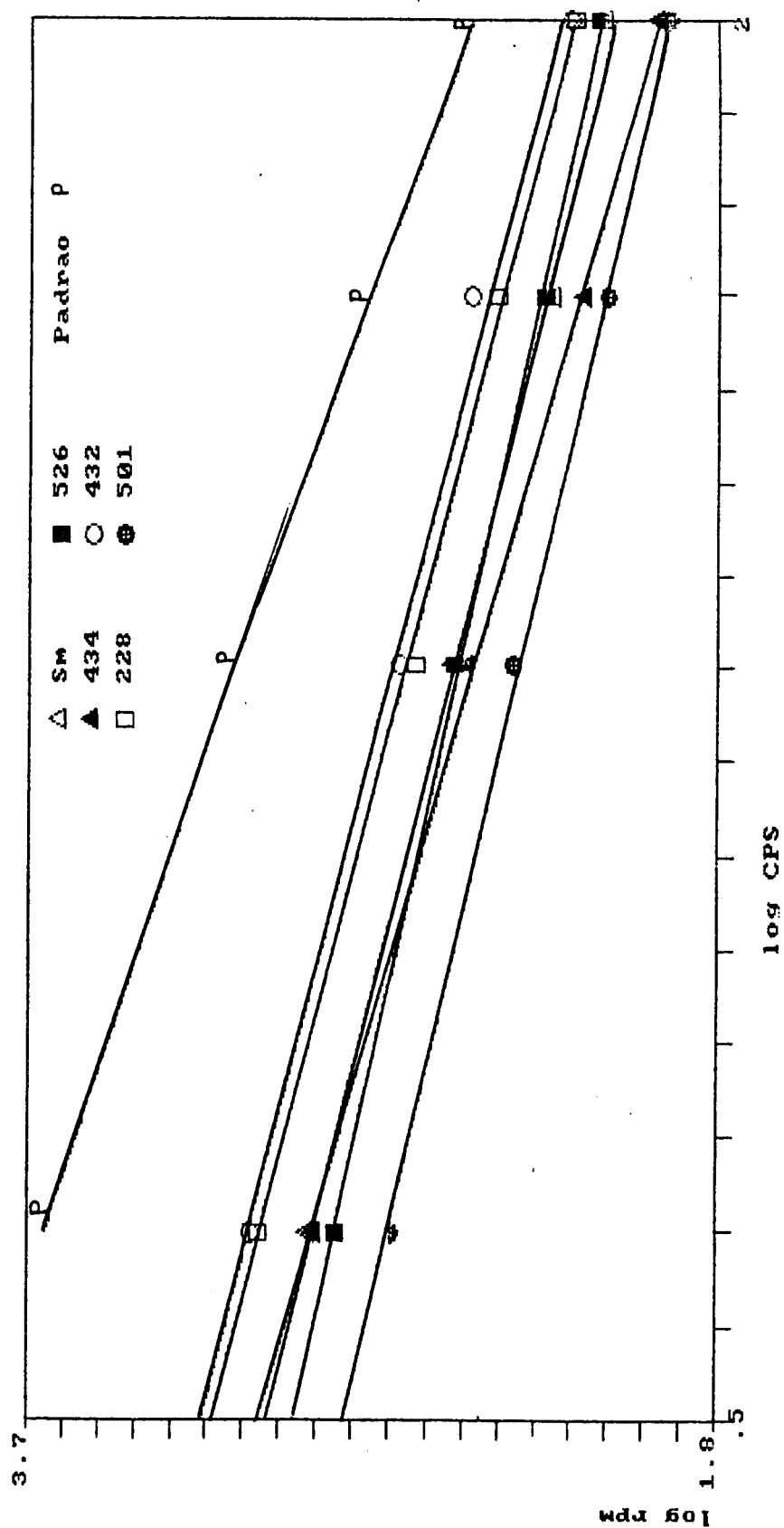
obs: A 2ª coluna (valores) indica a soma dos valores da
ordem crescente das médias.

As letras indicam grupos dentro dos quais não há
diferenças significativas entre as linhagens, ao
nível de 5% de significância.

TABELA 15b: Valores de viscosidade convertidos em valores
logarítmicos.

linh	log rot			
	0.699	1.301	1.699	2.000
5m ^B	2.916	2.528	2.255	2.105
434	2.903	2.486	2.169	1.960
228	3.060	2.635	2.411	2.194
526	2.845	2.528	2.279	2.130
432	3.079	2.677	2.484	2.207
501	2.699	2.364	2.105	1.936
padrão	3.648	3.130	2.758	2.475

GRÁFICO 3. Valores de viscosidade, em log, das gomas à pH 1.0.



4.5.5 Análise de viscosidade a pH 11.0

Podemos observar pela TABELA 16 que o resultado do teste de FRIEDMAN foi altamente significativo (22,07) e que a goma padrão apresentou os melhores valores de viscosidade. O segundo melhor resultado foi o do recombinante 432, sendo que as diferenças de viscosidade encontradas foram muito pequenas.

Comparando-se o 432 com a linhagem Sm^R, observamos que este apresentou valores superiores ao seu parental.

O GRÁFICO 4 e a TABELA 16b ilustram os valores de viscosidade, em logarítmo, das linhagens a pH 11.0.

No teste de paralelismo verificou-se que algumas linhagens se comportaram semelhantemente à goma padrão, apresentando valores para *t* não significativos quando comparados com esta última. Foram elas: Sm^R, 526 e 432 (Apêndice 11).

TABELA 16: Valores de viscosidade da goma das linhagens,
em CPS, a pH 11.0

linh	rot				SOC
	5	20	50	100	
Sm ^B	2325.00(4)	831.25(3)	405.00(3.5)	208.75(3)	13.5
434	1525.00(1)	575.00(1)	305.00(1)	176.25(1)	4
228	2250.00(3)	850.00(4)	405.00(3.5)	238.75(5)	15.5
526	2925.00(5)	943.75(5.5)	440.00(6)	236.25(4)	20.5
432	3425.00(7)	943.75(5.5)	435.00(5)	242.50(6)	23.5
501	1950.00(2)	687.50(2)	312.50(2)	193.75(2)	8
padrão	3275.00(6)	1006.25(7)	460.00(7)	266.25(7)	27

$$X^{\text{pr}} = 22.07 \text{ ***}$$

obs: Os valores apresentados são médias de 2 repetições.

Os números de 1 a 7 indicam a ordem crescente das médias.

A coluna SOC indica a soma da ordem crescente das médias.

TABELA 16a: Teste de FRIEDMAN para os valores de viscosidade
a pH 11.0

$$\Delta = 14$$

linhagens	valores	
padrão	27	a
432	23.5	a b
526	20.5	a b c
228	15.5	a b c d
5m [®]	13.5	b c d
501	08	c d
434	04	d

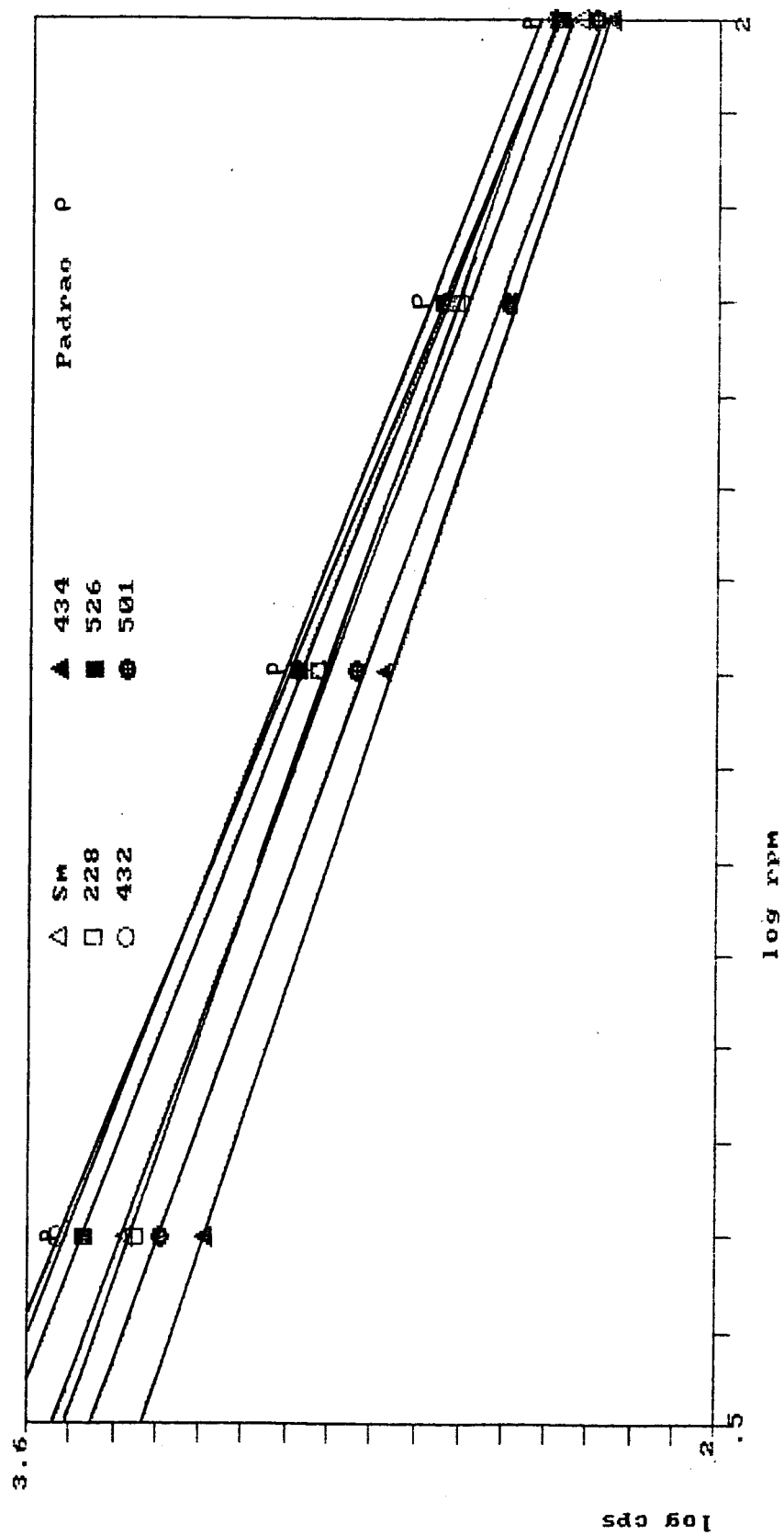
obs: A 2ª coluna (valores) indica a soma dos valores da
ordem crescente das médias.

As letras indicam grupos dentro dos quais não há
diferenças significativas entre as linhagens.

TABELA 16b: Valores de viscosidade convertidos em valores
logarítmicos

linh	log rot			
	0.699	1.301	1.699	2.000
5m ^B	3.366	2.920	2.607	2.320
434	3.183	2.760	2.484	2.246
228	3.352	2.929	2.607	2.378
526	3.466	2.975	2.643	2.373
432	3.535	2.975	2.638	2.385
501	3.290	2.837	2.495	2.287
padrão	3.515	3.002	2.663	2.425

GRÁFICO 4: Valores de viscosidade, em log, das gomas à pH 11.0.



5. Discussão

5.1 Transferência do Tn5 para Xanthomonas campestris pv. campestris

A frequência de transposição do Tn5 obtida através do cruzamento de Escherichia coli (F-lac::Tn5) com X. campestris variou de 2.5 à 3.0×10^{-8} por célula receptora.

Diferentes frequências de transposição do Tn5 têm sido detectadas por vários autores. Em E. coli, por exemplo, o Tn5 se transpõe do fago lambda para o cromossomo numa frequência de 10^{-9} (SHAW e BERG, 1979). Uma frequência mais baixa, em torno de 10^{-7} à 10^{-6} , tem sido detectada em Erwinia amylovora (STEINBERGER e BEER, 1988), em Rhizobium meliloti (BERG e BERG, 1983), em Pseudomonas syringae pv. tomato (CUPPELS, 1986), em Rhizobium fredii (KIM et al., 1988), assim como em Xanthomonas campestris (TURNER, 1984). As diferenças na frequência de transposição têm sido atribuídas a alguns fatores tais como o efeito do genoma da célula hospedeira, a atividade do inibidor de transposição codificado pelo Tn5 (BERG e BERG, 1983) ou ainda o tipo de vetor utilizado. TURNER et al. (1984), analisando a frequência de transferência do Tn5 em Xanthomonas campestris, verificou que se o vetor é um plasmídeo de espectro restrito de

hospedeiros a frequência de transposição é de aproximadamente 10^{-8} por célula receptora e se o vetor é um plasmídeo de espectro amplo de hospedeiros a frequência é de 10^{-5} à 10^{-2} . Portanto as diferenças na frequência de transposição podem, também, ser atribuídas ao tipo de plasmídeo utilizado.

Nas análises eletroforéticas, em gel de agarose, os 50 recombinantes e a linhagem receptora Sm^R não apresentaram banda plasmidial; esta só foi detectada na linhagem de Escherichia coli contendo o Tn5. Portanto foi suposto que o plasmídeo F[']₁₈ 114 lac::Tn5 apresentou comportamento suicida em Xanthomonas campestris e que o Tn5 se inseriu no genoma desta. O comportamento suicida deste plasmídeo já foi detectado em Shigella flexneri (SANSONETTI *et al.*, 1982). O uso de vetores suicidas contendo Tn5 tem sido adotado por vários autores pois este permite a seleção direta de mutações apenas pelo marcador de resistência a antibióticos conferido pelo elemento transponível. MEADE *et al.* (1982) e KIM *et al.*, (1988) utilizaram este recurso para obtenção de mutantes simbióticos e auxotróficos em Rhizobium meliloti e Rhizobium fredii, respectivamente; CUPPELS (1986) para obtenção de mutantes auxotróficos e de virulência em Pseudomonas syringae pv. syringae; SALCH e SHAW (1988) para caracterização de genes de patogenicidade em Pseudomonas syringae pv. tabaci, STEINBERGER e BEER (1988) para análise de mutantes de patogenicidade em Erwinia amylovora.

Para verificar a presença do Tn5 no genoma de Xanthomonas campestris, foi efetuada hibridação através da técnica "dot blot". A hibridação de colônias usando-se sondas de Tn5 marcadas (³²P-ATP) foi positiva apenas em poucos casos (8 em 132 recombinantes). Uma explicação para este fato poderia ser o baixo número de cópias de Tn5 pois a presença deste no genoma de uma bactéria inibe a transposição secundária (TURNER *et al.*, 1984).

Outra hipótese poderia ser a técnica. As colônias de Xanthomonas campestris possuem muita goma e esta poderia ter interferido, por exemplo, na ação da solução desnaturante no processo de hibridação.

5.2 Análise de auxotróficos

O aparecimento de mutantes auxotróficos parece ocorrer em baixa frequência com o uso do Tn5. Não foi detectado nenhum mutante auxotrófico no presente trabalho e estudos relacionados têm demonstrado uma grande variação na produção de tais mutantes. Em Pseudomonas syringae pv. tomato a frequência de auxotróficos foi de 1 % (CUPPELS, 1986), em Rhizobium meliloti, de 0.3 % (MEADE *et al.*, 1982), em Rhizobium fredii, de 0.5 % (KIM *et al.*, 1988) e em Xanthomonas campestris, de 0.2 % (TURNER *et al.*, 1984). DEBRUIJN e LUPSKI (1984) já observaram que o padrão de inserção, do Tn5, é completamente ao acaso, não havendo nenhum ponto preferencial. Entretanto CUPPELS (1986) sugere

que a distribuição nutricional de requerimentos entre auxotróficos de Pseudomonas syringae pv. tomato não foi totalmente ao acaso e observações similares foram feitas com mutagênese do Tn5 no genoma de Rhizobium meliloti (MEADE *et al.*, 1982), de Escherichia coli (SHAW e BERG, 1979) e de Pseudomonas syringae pv. syringae e pv. phaseolicola (ANDERSON e MILLS, 1985).

O não aparecimento de mutantes auxotróficos pode, portanto, ser atribuído ao número de mutantes testados.

5.3 Teste de fitopatogenicidade

O teste de patogenicidade "*in vitro*" utilizado, permitiu a caracterização inicial de um grande número de recombinantes. Foram registrados casos em que, dentre as oito repetições, somente uma apresentou sintomas característicos. Embora a linhagem tenha sido considerada patogênica, há evidência de que existe alguma falha que pode ser atribuída à técnica de inoculação, à escolha das folhas a serem testadas ou à variação no tipo de sementes utilizadas. A hipótese de falha no teste devido à idade da folha foi descartada uma vez que DANIELS *et al.* (1984a) relatam que a resposta de sintomas da doença não depende da idade da folha inoculada.

O aparecimento do halo verde no ponto da inoculação apresentado por algumas linhagens, no teste "*in vitro*", já foi observado em Pseudomonas syringae pv. syringae em

plantações de feijão (NIEPOLD *et al.*, 1985) e em *Erwinia amylovora*, em pera (STEINBERGER e BEER, 1988). Devido ao aparecimento de discos de couve com necrose e discos com halo verde apresentado por uma mesma linhagem, foi suposto que este último sintoma é apenas um passo intermediário da doença, pois, quando esta linhagem foi inoculada "*in vivo*", foram observados os sintomas característicos de infecção.

O teste de patogenicidade "*in vitro*" foi, portanto, considerado válido, pois permitiu a detecção de mutantes não patogênicos num período de tempo bem menor. Foi obtida uma frequência de 2.06 % de mutantes não virulentos, o que pode ser considerada uma alta frequência. DANIELS *et al.* (1984a) obtiveram apenas 0.3% deste tipo de mutante com o uso do mutagênico NTG (N-metil-N'-nitro-N-nitroso-guanidina), CUPPELS (1986) obteve 1%, através da inserção do Tn5, em *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* e MEADE *et al.* (1982) obteve apenas 0.07 % de mutantes para nodulação e 0.08 % de mutantes para fixação de nitrogênio em *Rhizobium meliloti*, usando também o Tn5 como agente mutagênico.

Vários autores têm isolado genes envolvidos no processo de patogenicidade. DANIELS *et al.* (1984b) clonaram genes envolvidos na patogenicidade de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* utilizando um plasmídio de amplo espectro de hospedeiros. TURNER *et al.* (1985) já mapearam um grupo de genes responsáveis pela patogenicidade em

Xanthomonas campestris pv. campestris e NIEPOLD et al. (1985) isolaram um fragmento de aproximadamente 8.5 Kb com genes envolvidos no processo de fitopatogenicidade em Pseudomonas syringae pv. syringae.

A caracterização dos mutantes não patogênicos não foi efetuada no presente trabalho, entretanto resultados obtidos por Rosato (comunicação pessoal) com o mutante de número 42 indicaram que este não apresentou produção de protease extracelular. Desconhece-se a correlação existente entre a produção desta enzima e fitopatogenicidade, entretanto TANG et al. (1987) apresentaram evidências de que o papel desempenhado por esta enzima é secundário.

A hipótese de que mutantes não patogênicos são deficientes na síntese de exopolissacarídeo (KELMAN, 1954) não pode ser confirmada. De 13 mutantes não patogênicos apenas um apresentou deficiência de viscosidade em colônias isoladas e por isso testes complementares com este mutante seriam necessários para se verificar tal hipótese..

5.4 Viscosidade dos recombinantes

Pouco se conhece sobre genes, enzimas ou mecanismos que controlam a síntese da xantana. Entretanto existe um considerável número de informações com respeito à síntese de polissacarídeo de várias espécies de bactérias gram-negativas (SUTHERLAND, 1979). A síntese de ácido colânico por Escherichia coli K-12 apresenta semelhanças com a

síntese de xantana. Ambos requerem a conversão de glucose à UDP glucose, UDP ácido glucurônico e GDP manose. Além disto, para a síntese de ácido colânico, o GDP manose deve ser convertido à GDP fucose e o UDP glucose em UDP galactose. O ácido colânico é produzido do GDP fucose, UDP galactose, UDP glucose e UDP ácido glucurônico; a xantana, por sua vez, é produzida pelos dois últimos açúcares citados mais GDP manose (THORNE *et al.*, 1987).

Os genes envolvidos nas vias biossintéticas destes polissacárides são frequentemente contíguos em bactérias entéricas. Vários genes essenciais à síntese de ácido colânico foram detectados à 45 minutos no mapa de *Escherichia coli* e foram denominados *cps* (TRISLER e GOTTESMAN, 1984). Já foram identificados vários loci genéticos envolvidos na biossíntese de ácido algínico de *Pseudomonas aeruginosa*, através de clonagem de genes (DARZINS e CHAKRABARTY, 1984; GOLDBERG e OHMAN, 1984). DARZINS *et al.* (1985) identificaram um grupo com seis genes envolvidos no processo. Genes envolvidos na síntese de exopolissacarídeo em *Rhizobium trifolii* foram clonados e utilizados para estudos relacionados com a formação de nódulos (CHUKRUVORTY *et al.*, 1982). HARDING *et al.* (1987) demonstraram, através da clonagem de vários genes essenciais à síntese da goma xantana, que alguns destes estão agrupados no genoma de *Xanthomonas campestris*. Já foram descritos, pelo menos, 3 loci, não ligados, com genes envolvidos na síntese de xantana (THORNE *et al.*, 1987).

O presente trabalho se limitou apenas em detectar mutantes com aumento de viscosidade em relação ao parental Sm^R. Contudo esta linhagem apresentou variação na produção de goma no decorrer dos experimentos. A variabilidade é uma característica existente em espécies do gênero Xanthomonas, inclusive Xanthomonas campestris. Apesar de crescer com facilidade em meios de culturas padronizados, já foi constatado ocorrência de variabilidade tanto em meios de cultura sólido (SUTTON e WILLIAMS, 1970), como em fermentação (CADMUS *et al.*, 1976) e fermentação contínua (SILMAN e ROGOVIN, 1972).

A variação na produção de goma pode ser associada com a formação de colônias pequenas denominadas tipo S a partir de colônias grandes denominadas tipo L. As colônias tipo L apresentam maior produção de goma com características normais, e as colônias tipo S resultam em baixa produção do biopolímero e com propriedades alteradas. A principal diferença estrutural detectada foi uma diminuição significativa da concentração de piruvato no polissacarídeo produzido pela colônia tipo S (CADMUS *et al.*, 1978). Normalmente isto acarreta uma diminuição no rendimento final da fermentação. Em adição, as variantes do tipo S apresentam uma maior taxa de crescimento, levando à uma rápida e séria deterioração da cultura, são resistentes a alguns antibióticos, à acridina orange e a certos fagos que são virulentos para colônias do tipo L (KIDBY *et al.*, 1977).

Além dos casos de fermentação, o desenvolvimento de colônias variantes pode ocorrer durante a manutenção da cultura. Procurando contornar este problema alguns autores têm testado diferentes formas de inóculo e de manutenção de culturas, sendo que dois fatores podem ser importantes: a concentração de glucose e o número de gerações.

A taxa de formação de variantes era diminuída quando o conteúdo de glucose no meio de estoque era suficiente para evitar a exaustão durante a estocagem (CADMUS *et al.* 1976). KIDBY *et al.* (1977) compararam o método de transferência convencional de tubos de meios de cultura inclinado com o método de tira de papel e verificaram que o último era mais eficiente, possivelmente devido ao menor número de gerações.

Devido à variação apresentada pela linhagem Sm^R, os melhores mutantes de viscosidade foram selecionados dentro de cada experimento.

Os recombinantes mostraram-se altamente estáveis no decorrer dos experimentos. As poucas variações detectadas entre as repetições, de alguns recombinantes, podem ser atribuídas ao fato de que foram utilizados pré-inóculos individuais, ou seja, as repetições não partiram de um pré-inóculo comum. Entretanto quando este último tipo de pré-inóculo foi utilizado para os cinco melhores recombinantes, nenhuma variação foi detectada.

Alguns autores já relataram que Pseudomonas aeruginosa pode ser induzida a produzir alginato com a utilização de

meios contendo antibióticos (GOVAN *et al.*, 1978). DERETIC *et al.*, (1986) analisaram a indução da amplificação de genes de Pseudomonas aeruginosa envolvidos com a síntese de alginato por exposição ao antibiótico kanamicina e verificaram que a adição deste antibiótico ao meio de cultura, leva a um fenótipo mucóide estável. Portanto a adição de kanamicina, tanto nas placas de repicagem quanto nos pré-inóculos para fermentação, pode ser responsável pela estabilidade dos recombinantes.

5.4.1 Análise da goma produzida pelos recombinantes

Os cinco melhores recombinantes selecionados foram submetidos à novas fermentações para análise da goma produzida.

No teste de viscosidade à várias rotações foram verificados comportamentos semelhantes de alguns recombinantes em relação à goma padrão, ou seja, embora apresentando valores de viscosidade inferiores ao padrão, o decréscimo de viscosidade destes foi proporcional ao apresentado pela goma padrão.

Segundo BAIRD *et al.* (1983) a viscosidade da goma xantana tende a zero em temperaturas acima de 135 °C. Os dados obtidos no teste de viscosidade à várias temperaturas comprovam este fato (TABELAS 14, 14a e 14b). Podemos observar que a viscosidade da goma padrão diminuiu com o aumento de temperatura, embora a medida de viscosidade tenha

sido efetuada apenas até aproximadamente 100 °C. Os recombinantes apresentaram valores inferiores de viscosidade contudo os testes de paralelismo demonstraram que estes se comportaram semelhantemente à goma padrão, não havendo diferenças significativas entre eles (Apêndice 9).

A goma produzida pelos recombinantes não sofreu grandes alterações em pH 11.0 (TABELA 16), se comparada com o pH 6.5 (TABELA 13). Entretanto foi detectado um grande decréscimo de viscosidade em pH 1.0 (TABELA 15). Segundo ROCKS (1971), a viscosidade é independente do pH entre 6.0 e 9.0 e sofre algumas alterações entre 1.0 e 11.0. Os dados apresentados pela goma padrão estão de acordo com este autor, entretanto os recombinantes apresentaram um decréscimo muito grande de viscosidade em pH extremamente ácido.

A viscosidade da goma xantana é atribuída ao seu peso molecular e à existência de radicais acetato e piruvato (CADMUS *et al.*, 1976; SANDFORD e BAIRD, 1983). A perda de viscosidade em pH ácido pode ser, portanto, decorrência da alteração de qualquer um destes fatores.

6. Conclusões

- A introdução do transposon Tn5 em Xanthomonas campestris pv. campestris proporcionou a obtenção de vários mutantes.
- A porcentagem de mutantes não patogênicos foi de aproximadamente 2%, num total de 581 clones testados.
- O teste de fitopatogenicidade "in vitro", utilizado, permitiu a análise de inúmeros recombinantes num período de tempo bem menor, se comparado com o teste "in vivo". Este método foi eficiente para uma pré-seleção de mutantes não patogênicos, entretanto testes complementares "in vivo" são sugeridos para confirmação destes mutantes.
- Os mutantes que causaram aumento de viscosidade mostraram-se altamente estáveis nas diversas fermentações efetuadas. Através das análises de viscosidade, foi verificado que estes apresentaram diferentes comportamentos. No teste à várias temperaturas todos os recombinantes e o parental Sm^R apresentaram comportamentos similares à goma padrão; no teste à várias rotações a similaridade com o padrão ocorreu nos recombinantes 228, 501, 526 e do parental Sm^R; no teste em pH 1.0 todos os recombinantes e o Sm^R tiveram um decréscimo de viscosidade altamente significativo e no teste em pH 11.0, os comportamentos semelhantes ao padrão foram apresentados pelos

recombinantes 432, 526 e pelo parental Sm[®]. O recombinante 432 foi o único recombinante que apresentou valores de viscosidade muito próximos e, às vezes, até superiores à goma padrão, exceto em pH 1.0.

7. Resumo

A bactéria Xanthomonas campestris é uma bactéria fitopatogênica responsável pela podridão negra em crucíferas e produtora da goma xantana.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de se avaliar diversos mutantes quanto à auxotrofia, fitopatogenicidade e aumento de viscosidade após a introdução do transposon Tn5 em um mutante Sm^R de Xanthomonas campestris (NRLL B-1459).

Os estudos revelaram que nenhum mutante auxotrófico foi detectado.

Foram realizados testes de fitopatogenicidade "in vitro". Este método permitiu a seleção de mutantes não patogênicos num período de tempo bem menor que o teste "in vivo". Estes mutantes foram, posteriormente, testados "in vivo", para confirmação dos dados. De um total de 581 clones testados, foi detectada uma frequência de aproximadamente 2% de mutantes não patogênicos.

Para o teste de viscosidade, foram testados 90 recombinantes, selecionados apenas pela característica mucóide apresentada por suas colônias. Dentre estes, foram selecionados cinco recombinantes que apresentaram altos valores de viscosidade. Eles foram submetidos a testes de viscosidade à várias rotações do viscosímetro, de temperatura e pH e comparados com a goma Keltrol, utilizada

comercialmente. Foi verificado que os recombinantes apresentaram comportamentos diferentes. No teste à várias rotações e em pH 6.5 os recombinantes 228, 526, 501 e o parental Sm[®] não apresentaram diferenças em relação à goma padrão. Já os recombinantes 432 e 434 apresentaram diferenças significativas. No teste de temperatura todos os recombinantes e o parental Sm[®] foram similares ao comportamento da goma Keltrol. No teste de viscosidade em pH 1.0 foi verificado que os valores de viscosidade da goma produzida pelos recombinantes e pela Sm[®] sofreram um decréscimo muito grande, em relação ao padrão.

Em pH 11.0, os recombinantes 432, 526 e o parental Sm[®] apresentaram comportamentos semelhantes ao padrão, sendo que o mesmo não foi verificado com os recombinantes 228, 434 e 501.

8. Summary

Xanthomonas campestris is a phytopathogenic bacteria which causes the black rot in crucifers and produces the xanthan gum.

The purpose of this study was obtain several different mutants in respect with three characteristics: auxotrophy, phytopathogenicity and viscosity after the introduction of transposon Tn5 in a mutant Sm^R of Xanthomonas campestris (NRRL B-1459).

No auxotrophic mutant could be detected.

Phytopathogenicity tests performed "in vitro" enabled nonpathogenic mutants selection in a shorter period of time than the usual "in vivo" tests. These mutants were, then, tested "in vivo" to confirm the results obtained. Five hundred eighty-one (581) recombinants were tested and a frequency of 2% lost the phytopathogenicity characteristic was detected.

Ninety (90) recombinants, selected by their mucoid characteristic, were tested for the viscosity broth culture. Among them, five recombinants showing the highest values of viscosity were analysed in different rotation, temperature and pH. It was found that these recombinants presented different behaviour compared to the Keltrol gum, except for the strain 432 which showed similarity in most characteristics.

Referências Bibliográficas

- AKROYD, J.E. e SYMONDS, N., 1983. Evidence for a conservative pathway of transposition of bacteriophage Mu. *Nature* (London). 303: 84-86.
- AKROYD, J.E.; BARTON, B.; LUND, P.; SMITH, S.M.; SULTANA, K. e SYMONDS, N., 1984. Mapping and properties of the gam and soi genes of Phage MU: Their possible roles in recombination. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 49:261-266.
- ANDERSON, D.M. e MILLS, D., 1985. The use of transposon mutagenesis in the isolation of nutritional and virulence mutants in two pathovars of Pseudomonas syringae. *Phytopathology*, 75:104-108.
- ARTHUR, A. e SHERRATT, D., 1979. Dissection of the transposition process: a transposon-encoded site-specific recombination system. *Molec. Gen. Genet.*, 175:267-274.
- AUERSWALD, E.A.; LUDWIG, G. e SCHALLER, H., 1980. Structural analysis of Tn5. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 45:107-113.
- BAIRD, J.K. ; SANDFORD, P.A. e COTTRELL, I.W., 1983. Industrial applications of some new microbial polysaccharides. *Bio/Technology*, 1:778-783.

- BARRERE, G.C.; BARBER, C.E. e DANIELS, M.J., 1986. Molecular cloning of genes involved in the production of the extracellular polysaccharide xanthan by Xanthomonas campestris pv. campestris. *Int. J. Biol. Macromol.*, 8: 372-374.
- BERG, D.E., 1977. Insertion and excision of the transposable kanamycin resistance determinant Tn5. In DNA insertion elements, plasmids and episomes (ed. A.I. BUKHARI et al.), p. 205. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- BERG, D.E.; EGNER, C.; HIRSCH, B.J.; HOWARD, J.; JOHNSRUD, L.; JORGENSEN, R.A. e TLSTY, T.D., 1980. Insertion excision and inversion of Tn5. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 45: 115-123.
- BERG, D.E.; JOHNSRUD, L.; McDIVITT, L.; RAMABHADHAN, R. e HIRSCH, B.J., 1982. Inverted repeats of Tn5 are transposable elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79:2632-2635.
- BERG, D.E., 1983. Structural requirement for IS 50 mediated gene transposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:792-796.
- BERG, D.E. e BERG, C.M., 1983. The prokaryotic transposable element Tn5. *Bio/Technology*, 1:417-435.

- BERG, D.E.; LODGE, J.; SASAKAWA, C.; NAG, D.D.; PHADNIS, S.H.; WESTON-HAFER, K. e CARLE, G.F., 1984. Transposon Tn5: Specific sequence recognition and conservative transposition. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **49**:215-226.
- BIEK, D. e ROTH, J.R., 1980a. Regulation of Tn5 transposition in Salmonella typhimurium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**:6047-6051.
- BIEK, D. e ROTH, J.R., 1980b. Regulation of Tn5 transposition. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **45**:189-192.
- BIRNBOIM, H.C. e DOLY, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**:1513-1523.
- BORTHAKUR, D.; BARBER, C.E.; LAMB, J.W.; DANIELS, M.J.; DOWNIE, J.A. e JOHNSTON, A.W.B., 1986. A mutation that blocks exopolysaccharide synthesis prevents nodulation of peas by Rhizobium leguminosarum but not beans by R. phaseoli and is corrected by cloned DNA from Rhizobium on the phytopathogen Xanthomonas. *Molec. Gen. Genet.*, **203**:320-323.
- CADMUS, M.C.; KNUTSON, C.A.; LAGODA, A.A.; PITTSLEY, J.E. e BURTON, K.A., 1978. Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermentors. *Biotech. and Bioeng.*, **20**:1003-1014.

- CADMUS, M.C.; ROGOVIN, S.P.; BURTON, K.A.; PITTSLEY, J.E.; KNUTSON, C.A. e JEANES, A., 1976. Colonial variation in Xanthomonas campestris NRRL B-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain. *Can. J. Microbiol.*, 22:942-948.
- CALOS, M.P. e MILLER, J.H., 1980. Transposable elements. *Cell*, 20:579-595.
- CHUKRUVORTY, A.K.; ZURKOWSKI, W.; SHINE, J. e ROLFE, B.G., 1982. Symbiotic nitrogen fixation: molecular cloning of Rhizobium genes involved in exopolysaccharide synthesis and effective nodulation. *J. Molec. Appl. Genetic*, 1:585-596.
- COOK, A.A.; WALKER, J.C. e LARSON, R.H., 1952. Studies on the disease cycle of black rot of crucifers. *Phytopathol.*, 42:162-167.
- COSTERTON, J.W.; IRVIN, R.T. e CHENG, K.J., 1981. The role of bacterial surface structures in pathogenesis. *Crit. Rev. Microbiol.*, 8:303-338.
- COTTRELL, I.W., 1979. Industrial potential of fungal and bacterial polysaccharides. In: SANDFORD e MATSUDA, eds. p. 251-270 (ACS Symposium Series, 126).
- CUPPELS, D.A., 1986. Generation and characterization of Tn5 insertion mutations in Pseudomonas syringae pv. tomato. *Appl. Environm. Microbiol.*, 51:323-327.

- DANIELS, M.J.; BARBER, C.E.; TURNER, P.C.; CLEARY, W.G. e SAWCZYK, M.K., 1984a. Isolation of mutants of Xanthomonas campestris pv. campestris showing altered pathogenicity. *J. Gen. Microbiol.*, 130:2447-2455.
- DANIELS, M.J.; BARBER, C.E.; TURNER, P.C.; SAWCZYK, M.K.; BYRDE, R.J.W. e FIELDING, A.H., 1984b. Cloning of genes involved in pathogenicity of Xanthomonas campestris pv. campestris using the broad host range cosmid pLAFR1. *EMBO J.*, 3:3323-3328.
- DANIELS, M.J.; COLLINGE, D.B.; DOW, J.M.; OSBOURN, A.E. e ROBERTS, I.N., 1987. Molecular biology of the interaction of Xanthomonas campestris with plants. *Plant Physiol. Biochem.*, 25:1-7.
- DARZINS, A. e CHAKRABARTY, A.M., 1984. Cloning of genes controlling alginate biosynthesis from a mucoid cystic fibrosis isolate of Pseudomonas aeruginosa. *J. Bacteriol.*, 159:9-18.
- DARZINS, A.; WANG, S. -K.; VANAGS, R.I. e CHAKRABARTY, A.M., 1985. Clustering of mutations affecting alginic acid biosynthesis in mucoid Pseudomonas aeruginosa. *J. Bacteriol.*, 164:516-524.
- DeBRUIJN, F.R. e LUPSKI, J.R., 1984. The use of transposon Tn5 mutagenesis in the rapid generation of correlated physical and genetic maps of DNA segments cloned into multicopy plasmids - a review. *Gene* 27:131-149.

- DERETIC, V.; TOMASEK, P.; DARZINS, A. e CHAKRABARTY, A.M., 1986. Gene amplification induces mucoid phenotype in rec-2 Pseudomonas aeruginosa exposed to kanamycin. *J. Bacteriol.*, 165:510-516.
- DITTA, G., 1986. Tn5 mapping of Rhizobium nitrogen fixation genes. *Methods Enzymol.*, 118:519-528.
- DOWSON, W.J., 1939. On the systematic position and generic names of the gram negative bacterial plant pathogens. *Zentralbl. Bakteriол. Parasitenk. Infektionskr. Hyg., Abt. 2* 100:177-193.
- DUNCAN, M.J., 1981. Properties of Tn5 induced carbohydrate mutants in Rhizobium meliloti. *J. Gen. Microbiol.*, 122:61-67.
- DYE, D.W., 1962. The inadequacy of the usual determinative tests for the identification of Xanthomonas spp. *N.Z.J. Sci.*, 5:393-416.
- DYE, D.W.; BRADBURY, J.F.; GOTO, M.; HAYWARD, A.C. ; LELLIOTT, R.A. e SCHROTH, M.N., 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Rev. Plant Pathol.*, 59: 153-168.

- FORRAI, T.; VINCZE, E.; BANFALVI, Z.; KISS, G.B.; RANDHAWA, G.S. e KONDOROSI, A., 1983. Localization of symbiotic mutations in Rhizobium meliloti. *J. Bacteriol.*, 153:635-643.
- GENILLAUD, O.; GARRIDO, M.C. e MORENO, F., 1984. The transposon Tn5 carries a bleomycin resistance determinant. *Gene*, 32:225-233.
- GHOLSON, R.K. e ESSENBERG, M., 1986. An extracellular protease-deficient mutant of Xanthomonas campestris pv. malvacearum maintains its pathogenicity to cotton. *Phytopathol.*, 76:1140.
- GOLDBERG, J.B. e OHMAN, D.E., 1984. Cloning and expression in Pseudomonas aeruginosa of a gene involved in the production of alginate. *J. Bacteriol.*, 158:1115-1121.
- GOVAN, J.R.W. e FYFE, A.M., 1978. Mucoid Pseudomonas aeruginosa and cystic fibrosis: resistance of the mucoid form to carbenicillin, flucloxacillin and tobramycin and the isolation of mucoid variants in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.*, 4:233-240.
- GRINDLEY, N.D.F. e REED, R.R., 1985. Transpositional recombination in prokaryotes. *Ann. Rev. Biochem.*, 54:863-896.

- HARDING, N.E.; CLEARY, J.M.; CABANAS, D.K.; ROSEN, I.G. e KANG, K.S., 1987. Genetic and physical analysis of a cluster of genes essential for xanthan gum biosynthesis in Xanthomonas campestris. *J. Bacteriol.*, 169:2854-2861.
- HARSHEY, R.M., 1984a. Transposition without duplication of infecting bacteriophage MU DNA. *Nature (London)* 311:580-581.
- HARSHEY, R.M., 1984b. Nonreplicative DNA transposition: integration of infecting bacteriophage Mu. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 49:273-278.
- ISBERG, R.R. e SYVANEN, M., 1981. Replicon fusions promoted by the inverted repeats of Tn5: the right stem is an insertion sequence. *J. Molec. Biol.*, 150:15-32.
- JEANES, A.; PITTSLEY, J.E. e SENTI, F.R., 1961. Polysaccharide B-1459: a new hidrocolloid polyelectrolyte produced from glucose by bacterial fermentation. *J. Appl. Polymer Sci.*, 5:519-526.
- JOHNSON, R.C. e REZNIKOFF, W.S., 1984. Copy number control of Tn5 transposition. *Genetics*, 107:9-18.
- JORGENSEN, R.A.; ROTHSTEIN, S.J. e REZNIKOFF, W.S., 1979. A restriction enzyme cleavage map of Tn5 and location of a region encoding neomycin resistance. *Mol. Gen. Genet.*, 177:65-72.

- KELMAN, A., 1954. The relationship of pathogenicity in Pseudomonas solanacearum to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathol.*, 44:693.
- KIDBY, D.; SANDFORD, P.; HERMAN, A. e CADMUS, M.C., 1977. Maintenance procedures for the curtailment of genetic instability: Xanthomonas campestris NRRL B_ 1459. *Appl. Environm. Microbiol.*, 33:840-845.
- KIM, C. -H.; KUYKENDALL, L.D.; SHAH, K.S. e KEISTER, D.L., 1988. Induction of symbiotically defective auxotrophic mutants of Rhizobium fredii HH303 by transposon mutagenesis. *Appl. Environm. Microbiol.*, 54:423-427.
- KLECKNER, N.; CHAN, R.K.; TYE, B. -K. e BOTSTEIN, D. 1975. Mutagenesis by insertion of a drug resistance element carrying an inverted repetition. *J. Molec. Biol.*, 97:561-575.
- KLECKNER, N.; ROTH, J. e BOTSTEIN, D., 1977. Genetic engineering in vivo using translocatable drug-resistance elements. New methods in bacterial genetics. *J. Molec. Biol.*, 116:125-159.
- KLECKNER, N., 1981. Transposable elements in prokaryotes. *Ann. Rev. Genet.*, 15:341-404.
- KLECKNER, N.; MORISATO, D.; ROBERTS, D. e BENDER, J., 1984. Mechanism and regulation of Tn10 transposition. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 49:235-244.

- LANZA, S.A. e ROSATO, Y.B., 1986. Produção de goma xantana por diferentes mutantes e recombinantes de Xanthomonas campestris. In: Reunião Anual de Genética de Microrg., Ribeirão Preto.
- LEIGH, J.A.; SIGNER, E.R. e WALKER, G.C., 1985. Exopolysaccharide-deficient mutants of Rhizobium meliloti that form ineffective nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82:6231-6235.
- LIEBART, J.C.; GHELARDINI, P. e PAOLOZZI, L., 1982. Conservative integration of bacteriophage Mu DNA into pBR322 plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79:4362-4366.
- LOWE, J.B. e BERG, D.E., 1983. A product of the Tn5 transposase gene inhibits transposition. *Genetics*, 103:605-615.
- MARQUET, M.; MIKOLAJCZAK, M.; THORNE, L. e POLLOCK, T., 1989. Improved strains for production of xantan gum by fermentation of Xanthomonas campestris. *J. Ind. Microbiol.* 4:55-64.
- MAZODIER, P.; GIRAUD, E. e GASSER, F., 1982. Tn5 dependent streptomycin resistance in Methylobacterium organophilum. *FEMS Microbiol. Lett.*, 13:27-30.

- MEADE, H.M.; LONG, S.R.; RUUKUN, G.B.; BROWN, S.E. e AUSUBEL, F.M., 1982. Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of Rhizobium meliloti induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J. Bacteriol.*, 149:114-122.
- MORAINÉ, R.A. e ROGOVIN, P., 1966. Kinetics of polysaccharide B-1459 fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, 8:511-524.
- NIEPOLD, F.; ANDERSON, D. e MILLS, D., 1985. Cloning determinants of pathogenesis from Pseudomonas syringae pv. syringae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82:406-410.
- NODA, T.; SATO, Z.; KABAYASHI, H.; IWASAKI, S. e OKUDA, S., 1980. Isolation and structural elucidation of phytotoxic substances produced by Xanthomonas campestris pv. oryzae (ISHIYAMA) DYE. *Ann. Phytopathol. Society Japan*, 46:663-666.
- OSBURN, A.E.; BARBER, C.E. e DANIELS, M.J., 1987. Identification of plant-induced genes of the bacterial pathogen Xanthomonas campestris pv. campestris using a promoter-probe plasmid. *EMBO J.*, 6:23-28.

- PERREAUX, D.; MARATTE, H. e MEYER, J.A., 1982. Identification of 3 (methylthio) propionic acid as a blight-inducing toxin produced by Xanthomonas campestris pv. manihoti in vitro. *Physiolog. Plant Pathol.*, 20:313-319.
- PUTNOKY, P.; KISS, G.B.; OTT, I e KONDOROSI, A., 1983. Tn5 carries a streptomycin resistance determinant downstream from the kanamycin resistance gene. *Mol. Gen. Genet.*, 191:228-294.
- REDDY, M.N.; STUTEVILLE, D.L. e SORENSEN, E.L., 1971. Protease production during pathogenesis of bacterial leaf spot of alfafa and by Xanthomonas alfalfae in vitro. *Phytopathol.*, 61:361-365.
- ROCKS, J.K., 1971. Xanthan gum. *Food Technol.*, 25:22-31.
- ROTHSTEIN, S.J.; JORGENSEN, R.A.; POSTLE, K. e REZNIKOFF, W.S., 1980. The inverted repeats of Tn5 are funcionally different. *Cell*, 19:795-805.
- ROTHSTEIN, S.J. e REZNIKOFF, W.S., 1981. The funcional differences in the inverted repeats of Tn5 are caused by single base pair nonhomology. *Cell*, 23:191-199.
- SALCH, Y.P. e SHAW, P.D., 1988. Isolation and characterization of pathogenicity genes of Pseudomonas syringae pv. tabaci. *J. Bacteriol.*, 170:2584-2591.

- SANDFORD, P.A., 1979. Extracellular microbial polysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 36:256-310.
- SANDFORD, P.A. e BAIRD, J., 1983. Industrial utilization of polysaccharides. In: ASPINALL, G.O., ed. *The polysaccharides*, v.2. New York, Academic Press., p. 411-490.
- SANDVICK, E.I. e MAERKER, J.M., 1977. Application of xanthan gum for enhanced oil recovery. In: SANDFORD, P.A. e LASKIN, A., eds. (*ACS Symposium Series*, 45, p. 242-264).
- SANSONETTI, P.J.; KOPECKO, D.J. e FORMAL, S.B., 1982. Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. *Infect. Immunity*, 35:852-860.
- SASAKAWA, C.; LOWE, J.B.; McDIVITT, L. e BERB, D.E., 1982. Control of transposon Tn5 transposition in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79: 7450-7454.
- SHACKLETON, D.A.; 1966. A study of the relationship between *Xanthomonas vesicatoria* (DODGE, 1920), DOWSON, 1939, and *Xanthomonas campestris* (PAMMEL, 1895), DOWSON, 1939. *New Zealand J. Sci.*, 9:507-522.

- SHAPIRO, J.A., 1979. Molecular model for the transposition and replication of bacteriophage Mu and other transposable elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76:1933-1937.
- SHAW, K.J. e BERG, C.M., 1979. Escherichia coli K-12 auxotrophs induced by insertion of the transposable element Tn5. *Genetics*, 92:741-749.
- SHEARMAN, C.A.; ROSSEN, L.; JOHNSTON, A.W.B. e DOWNIE, J.A., 1986. The Rhizobium leguminosarum nodulation gene nod F encodes a polypeptide similar to acylcarrier protein and is regulated by nod D plus a factor in pea root exudate. *EMBO J.*, 5:647-652.
- SILMAN, R.W. e ROGOVIN, P., 1972. Continuous fermentation to produce xanthan biopolymer: effect of dilution rate. *Biotechn. and Bioeng.*, 14:23-31.
- SMITH, E.F., 1897. Pseudomonas campestris (PAMMEL): the cause of brown rot in cruciferous plants. *Zentralblatt fur Bakteriologie*, 3:284-291.
- SOW, P. e DEMAIN, A.L., 1979. Nutritional studies on xanthan production by Xanthomonas campestris NRRL B-1459. *Appl. Environm. Microbiol.*, 31:1186-1192.

- STACHEL, S.E.; MESSENS, E.; VAN MONTAGU, M. e ZAMBRYSKI, P., 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in Agrobacterium tumefaciens. *Nature*, 318:624-629.
- STARR, M.P. e NASUNO, S., 1967. Pectolytic activity of phytopathogenic xanthomonads. *J. Gen. Microbiol.*, 46:425-433.
- STASKAWICZ, B.J.; DAHLBECK, D. e KEEN, N.T., 1984. Cloned avirulence gene of Pseudomonas syringae pv. glycinea determines race-specific incompatibility on Glycine max (L.). *Merr. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81:6024-6028.
- STEINBERGER, E.M. e BEER, S.V., 1988. Creation and complementation of pathogenicity mutants of Erwinia amylovora. *Molec. Plant-microbe interact.*, 1:135-144.
- SUTHERLAND, I.W., 1979. Microbial exopolysaccharides: control of synthesis and acylation. p.1-34. In: R.C.W. Berkeley, G.W. Gooday, and D.C. Elwood (eds.), *Microbial polysaccharides and polysaccharases*. Academic Press, Inc. (London), Ltd., London.

- SUTTON, J.C. e WILLIAMS, P.H., 1970. Comparison of extracellular polysaccharide of Xanthomonas campestris from culture and from infected cabbage leaves. *Canadian J. Botany*, 48:645-651.
- TANG, J.L.; GOUGH, C.L.; BARBER, C.E.; DOW, J.M. e DANIELS, M.J., 1987 Molecular cloning of protease gene (s) from Xanthomonas campestris pv. campestris: expression in Escherichia coli and role in pathogenicity. *Mol. Gen. Genet.*, 210:443-448.
- THORNE, L.; TANSEY, L. e POLLOCK, T.J., 1987. Clustering of mutations blocking synthesis of xanthan gum by Xanthomonas campestris. *J. Bacteriol.*, 169:3593-3600.
- TRISLER, P. e GOTTESMAN, S., 1984. lon transcriptional regulation of genes necessary for capsular polysaccharide synthesis in Escherichia coli K-12. *J. Bacteriol.*, 160:184-191.
- TURNER, P.; BARBER, C. e DANIELS, M.J. 1984. Behavior of the transposons Tn5 e Tn7 in Xanthomonas campestris pv. campestris. *Molec. Gen. Genet.*, 195: 101-107.
- TURNER, P.; BARBER, C. e DANIELS, M.J., 1985. Evidence for clustered pathogenicity genes in Xantomonas campestris pv. campestris. *Molec. Gen. Genet.*, 199:338-343.

- WALSH, P.M.; HAAS, M.J. e SOMKUTI, G.A., 1984. Genetic construction of lactose - utilizing Xanthomonas campestris. *Appl. Environm. Microbiol.*, 47:253-257.
- WELLS, J., 1977. Extracellular microbial polysaccharides. A critical overview. In: SANDFORD, P.A. e LASKIN, A., eds. (*ACS Symposium Series*, 45, p. 299-325.
- WILKINSON, J.F., 1958. The extracellular polysaccharides of bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 22:46-73.
- WILLIAMS, P.H., 1980. Black rot: a continuing threat to world crucifers. *Plant Dis.*, 64:736-742.

Apêndice 1: Análise de variância - experimento 1

Causas variação	GL	Soma Quadr.	Quadr. médio	F	
Tratamentos	22	291484.20	132491.55	24.58***	
Resíduos	46	247917.00	5389.50		
Total	68	3162731.20			

Apêndice 2: Análise de variância - Experimento 2

Causas variação	GL	Soma Quadr.	Quadr. Médio	F	
Tratamentos	10	1782632.60	178263.26	38.23***	
Resíduos	22	102604.20	4663.83		
Total	32	1885236.80			

Apêndice 3: Análise de variância - Experimento 4

Causas variação	GL	Soma Quadr.	Quadr. Médio	F	
Tratamentos	9	705104.20	78345.00	9.30**	
Resíduos	20	168437.97	8421.90		
Total	29	873542.17			

Apêndice 4: Análise de variância - Experimento 4

Causas variação	GL	Soma Quadr.	Quadr. Médio	F
Tratamentos	11	775151.83	70468.35	21.11***
Resíduos	24	80104.30	3337.68	
Total	35	855256.13		

Apêndice 5: Análise de variância - Experimento 5

Causas variação	GL	Soma Quadr.	Quadr. Médio	F
Tratamentos	10	2246931.30	224693.13	18.30***
Resíduos	22	270118.30	12278.10	
Total	32	2517049.60		

Apêndice 6: Análise de variância - Experimento 6

Causas Variação	GL	Soma Quadr.	Quadr. Médio	F
Tratamentos	29	3230821.10	111407.62	52.02****
Resíduos	60	128504.40	2141.74	
Total	89	3359325.50		

Apêndice 7: Peso seco da goma das linhagens num total de 100
ml de caldo de fermentação

linhagens	Peso seco em gramas	
228	1.20	---
432	1.25	---
434	1.28	---
501	1.20	---
526	1.02	---
Sm ^B	1.00	---

Apêndice 8: Teste de paralelismo entre as retas obtidas na
análise de viscosidade à várias rotações

Para 4 GL ao nível de 5% temos 2.776

$$\begin{aligned} t_{(8m^R, P_{adr}K_0)} &= 0.85 \text{ n. sign.} & t_{(526, P_{adr}K_0)} &= 1.31 \text{ n. sign.} \\ t_{(434, P_{adr}K_0)} &= 2.93 * & t_{(432, P_{adr}K_0)} &= 3.70 * \\ t_{(220, P_{adr}K_0)} &= 1.68 \text{ n. sign.} & t_{(501, P_{adr}K_0)} &= 0.98 \text{ n. sign.} \end{aligned}$$

Retas obtidas

$$\begin{aligned} Y_{8m^R} &= 3.8416 - 0.8134 X \\ Y_{434} &= 4.1669 - 0.9041 X \\ Y_{220} &= 3.9725 - 0.8426 X \\ Y_{526} &= 3.9745 - 0.8342 X \\ Y_{432} &= 4.1977 - 0.9124 X \\ Y_{501} &= 3.8957 - 0.8168 X \\ Y_{P_{adr}K_0} &= 4.0401 - 0.7800 X \end{aligned}$$

Apêndice 9: Teste de paralelismo entre as retas obtidas na
análise de viscosidade à várias temperaturas.

Para 4 GL ao nível de 5% = 2.776

$$t_{(8m^R, P_{adr}K_0)} = 2.58 \text{ n. sign.} \quad t_{(526, P_{adr}K_0)} = 2.24 \text{ n.sign.}$$

$$t_{(434, P_{adr}K_0)} = 0.40 \text{ n. sign.} \quad t_{(432, P_{adr}K_0)} = 0.69 \text{ n.sign.}$$

$$t_{(228, P_{adr}K_0)} = 1.65 \text{ n. sign.} \quad t_{(501, P_{adr}K_0)} = 1.50 \text{ n.sign.}$$

Retas obtidas:

$$Y_{8m^R} = 2.8650 - 0.5297 X$$

$$Y_{434} = 2.6736 - 0.3790 X$$

$$Y_{228} = 2.7809 - 0.4528 X$$

$$Y_{526} = 2.9259 - 0.5078 X$$

$$Y_{432} = 2.7829 - 0.3887 X$$

$$Y_{501} = 2.8569 - 0.4728 X$$

$$Y_{P_{adr}K_0} = 3.0356 - 0.3518 X$$

Apêndice 10: Teste de paralelismo entre as retas obtidas na
análise de viscosidade em pH 1.0

Para 4GL ao nível de 5% de significância temos 2.776

$$\begin{array}{ll} t_{(5m^R, P_{adr}K_0)} = 9.67^{**} & t_{(526, P_{adr}K_0)} = 14.70^{**} \\ t_{(434, P_{adr}K_0)} = 7.60^{**} & t_{(432, P_{adr}K_0)} = 5.24^* \\ t_{(228, P_{adr}K_0)} = 9.10^{**} & t_{(501, P_{adr}K_0)} = 14.44^{**} \end{array}$$

Retas obtidas:

$$\begin{array}{ll} Y_{5m^R} & = 3.3523 - 0.6326 X \\ Y_{434} & = 3.4196 - 0.7300 X \\ Y_{228} & = 3.5121 - 0.6577 X \\ Y_{526} & = 3.2378 - 0.5561 X \\ Y_{432} & = 3.5358 - 0.6486 X \\ Y_{501} & = 3.1180 - 0.5910 X \\ Y_{P_{adr}K_0} & = 4.2870 - 0.9014 X \end{array}$$

Apêndice 11: Teste de paralelismo entre as retas obtidas na
análise de viscosidade em pH 11.0

Para 4 GL ao nível de 5% de significância temos 2.776.

$$\begin{aligned} t_{(8m^R, \text{PadrKo})} &= 1.42 \text{ n.sign.} & t_{(524, \text{PadrKo})} &= 0.25 \text{ n.sign.} \\ t_{(434, \text{PadrKo})} &= 8.80^{**} & t_{(432, \text{PadrKo})} &= 2.11 \text{ n.sign.} \\ t_{(228, \text{PadrKo})} &= 4.80^{*} & t_{(501, \text{PadrKo})} &= 2.89^{*} \end{aligned}$$

Retas obtidas:

$$\begin{aligned} Y_{8m^R} &= 3.9372 - 0.7959 X \\ Y_{434} &= 3.5859 - 0.7155 X \\ Y_{228} &= 3.8868 - 0.7512 X \\ Y_{524} &= 4.0569 - 0.8371 X \\ Y_{432} &= 4.1427 - 0.8840 X \\ Y_{501} &= 3.8375 - 0.7793 X \\ Y_{\text{PadrKo}} &= 4.0990 - 0.8407 X \end{aligned}$$

Apêndice 12: Viscosidade dos recombinantes contendo Tn5 (em
CPS) à 100 rpm - experimento 1

linhagens	1 ^a	2 ^a	3 ^a	média
Sm ^B	220.0	250.0	240.0	236.67
08	95.0	97.5	107.5	100.00
09	152.5	140.0	132.5	141.67
18	220.0	192.5	187.5	200.00
23	145.0	180.0	150.0	158.34
28	132.5	120.0	107.5	120.00
48	245.0	235.0	235.0	238.34
55	220.0	180.0	192.5	197.50
71	240.0	245.0	195.0	226.67
75	155.0	160.0	160.0	158.34
98	135.0	165.0	157.5	152.50
101	80.0	65.0	70.0	71.67
105	185.0	125.0	125.0	145.00
117	170.0	180.0	177.5	175.84
118	175.0	180.0	180.0	178.34
119	135.0	125.0	100.0	120.00
125	25.0	30.0	35.0	30.00
137	45.0	55.0	45.0	48.34
143	115.0	115.0	182.5	137.50
150	105.0	112.5	87.5	101.67
159	172.5	157.5	156.0	162.00
165	75.0	50.0	155.0	93.34
169	172.5	220.0	170.0	187.50

Apêndice 13: Viscosidade dos recombinantes contendo Tn5 (em
CPS) à 100 rpm - experimento 2

linhagens	1 ^a	2 ^a	3 ^a	média
Sm ^R	155.0	225.0	157.5	179.17
02	180.0	177.5	207.5	188.34
80	70.0	77.5	72.5	73.34
91	40.0	42.5	35.0	39.17
138	140.0	132.5	125.0	132.50
228	232.5	250.0	210.0	230.84
231	32.5	27.5	17.5	25.84
282	152.5	145.0	155.0	150.84
283	15.0	22.5	10.0	15.84
307	117.5	102.5	70.0	96.67
309	65.0	65.0	147.5	92.50

Apêndice 14: Viscosidade dos recombinantes contendo Tn5
(em CPS) à 100 rpm - Experimento 3

Repetições				
linhagens	1 ^a	2 ^a	3 ^a	média
Sm ^R	110.0	120.0	110.0	116.67
301	120.0	127.5	130.0	125.84
302	207.5	285.0	250.0	247.50
306	237.5	150.0	130.0	172.50
312	170.0	250.0	170.0	196.67
314	130.0	155.0	247.5	177.50
317	245.0	187.5	237.5	223.34
329	235.0	195.0	257.5	229.17
338	162.5	235.0	190.0	195.84
357	225.0	172.5	225.0	207.50

Apêndice 15: Viscosidade dos recombinantes contendo Tn5
em CPS) à 100 rpm - Experimento 4

linhagens	Repetições			média
	1ª	2ª	3ª	
Sm ^R	67.5	65.0	65.0	65.84
366	112.5	107.5	120.0	113.34
377	142.5	140.0	140.0	140.84
379	125.0	122.5	125.0	124.17
382	120.0	127.5	135.0	127.50
383	77.5	75.0	85.0	79.17
384	157.5	147.5	135.0	146.67
385	72.5	82.5	52.5	69.17
397	127.5	162.5	132.5	140.84
399	112.5	37.5	25.0	58.34
401	147.5	117.5	97.5	120.84
420	290.0	262.5	310.0	287.50

Apêndice 16: Viscosidade dos recombinantes contendo Tn5
(em CPS) à 100 rpm - Experimento 5

linhagens	Repetições			
	1ª	2ª	3ª	média
Sm ^R	215.0	175.0	180.0	190.00
336	157.5	161.5	170.0	163.34
405	107.5	122.5	97.5	109.17
419	55.0	80.0	55.0	63.34
432	250.0	255.0	292.5	265.84
434	287.5	277.5	285.0	283.34
438	257.5	97.5	152.5	169.17
464	255.0	187.5	170.0	204.17
472	180.0	300.0	180.0	220.00
478	100.0	85.0	87.5	90.84
479	120.0	135.0	117.5	124.17

Apêndice 17: Viscosidade dos recombinantes contendo Tn5

(em CPS) à 100 rpm - Experimento 6

linhagens	1 ^a	2 ^a	3 ^a	média
Sm ^R	107.5	122.5	107.5	112.50
481	182.5	170.0	175.0	175.84
486	100.0	95.0	120.0	105.00
487	242.5	235.0	225.0	234.17
490	195.0	187.5	237.5	206.67
493	182.5	187.5	218.5	195.00
495	240.0	237.5	262.5	246.67
496	295.0	287.5	265.0	282.50
501	262.5	275.0	255.0	264.17
510	262.5	230.0	175.0	222.50
511	200.0	235.0	242.5	225.84
512	167.5	175.0	170.0	170.84
513	152.5	185.0	220.0	185.34
514	155.0	155.0	157.5	155.84
515	152.5	175.0	170.0	165.84
522	250.0	255.0	260.0	255.00
526	272.5	235.0	197.5	235.00
542	155.0	162.5	150.0	155.84
554	165.0	197.5	205.0	189.17
565	132.5	140.0	152.5	141.67
139	200.0	215.0	230.0	215.00
159	167.5	157.5	177.5	167.50
179	230.0	227.5	177.5	211.67
189	205.0	247.5	272.5	241.67

Apêndice 17: Viscosidade dos recombinantes contendo Tn5
 (em CPS) à 100 rpm - Experimento 6
 (continuação)

linhagens	Repetições			
	1ª	2ª	3ª	média
190	102.5	100.0	105.0	102.50
228	302.5	350.0	335.0	329.17
537	265.0	260.0	195.0	240.00
282	200.0	207.5	290.0	232.50
362	200.0	195.0	207.5	200.84
34	167.5	177.5	170.0	171.67