

BC/18633
IB/80736



UNICAMP

T/UNICAMP

M348_i



**ISOLAMENTO DE GENES
ENVOLVIDOS NA
PATOGENICIDADE DE
Xanthomonas campestris pv.
vesicatoria.**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Lyriam Lobo Rosa Marques
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Y. Bomura 21/12/92

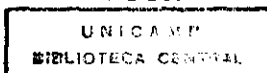
Lyriam Lobo Rosa Marques

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Yoko Bomura Rosato

Campinas - SP

1992



UNIDADE	IB/194
N.º CHEMISTAS	M348i
V.	
T.	18633
PREÇO	264/93
C	x
PREÇO CUB	100.000,00
DATA	30/04/93
N.º CPD	

CM000375185

AGRADECIMENTOS

Aos professores:

Dr. Avelino de Oliveira, pelo incentivo e apoio em meus primeiros passos na vida acadêmica.

Dr. Aquiles Piedrabuena, pela acessoria na análise dos resultados e pelo excelente humor com que se dispõe a ensinar.

Dra. Laura Ottoboni, pelas sugestões e discussões produtivas ao longo do desenvolvimento deste trabalho, pela paciência na leitura do mesmo e pelo apoio desses últimos tempos.

Dr. Paulo Arruda, pelo acesso ao laboratório .

Dr. Adilson Leite, pelas sugestões e aconselhamento técnico.

Dra. Laudenir Prioli, pelas sugestões e conselhos .

Dr. Wanderley D. Silveira, pela disponibilidade na leitura e discussão deste trabalho.

Dra. Vera N. S. Rothman, pelo "help" com o tema de qualificação e com o apoio no fim de tese.

As super secretárias:

Sandrinha, Berenice e Tânia, do CBMEG, pela competência, disposição e alto astral com que exercem sua função, facilitando (e muito!) a vida da moçada do CBMEG quanto às burocracias da vida.

Sílvia e Teresa, da Secretaria da Genética, cuja eficiência permitiu o encaminhamento das burocracias de tese em tempo hábil.

À Sandra e ao Wilson, pela colaboração na parte técnica aqui no lab.

Ao povo do lab de Biologia Molecular de Plantas: Germano, Luzão, Sílvia, Andrés, Isa, David, todos, enfim, pela colaboração e agradável convivência.

Ao pessoal da Genética de insetos, em especial à Rosângela, pela super ajuda com as fotos.

Ao pessoal da Genética Humana, pela força e acesso ao laboratório.

Aos amigos:

À Andréa Franco e Lucinha, partners de apartamento, pela ótima convivência .

Ao Edson "Baiano", pela amizade e apoio.

À galera da Bio Unicamp, especialmente a "turma de 87", de onde vim.

Ao Bello (Wagner), por tudo.

À Ana Paula e João & Ju, pelo apoio e amizade.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

\A super Yoko-sensei, muito mais do que orientadora, pela confiança, incentivo, apoio, compreensão, amizade e pelo excelente clima de trabalho que mantém no lab.

\A Dra. Ana Spin, pela disposição e paciência na leitura deste trabalho, pelas contribuições ao mesmo e acima de tudo, pelo apoio e força com que sempre pude contar.

\A galera aqui do lab: às internacionais Andréa e Rejane, à desaparecida Lerinha ("Lérida Cristina"), ao Ed (Plus!), à Giu (Georrrrrrgia), à Susinha (Susi Kill), à (Br)Ângela.

A super Re(u), por tudo !!!!!!!! (nem dá pra enumerar!)

A Val ("amiuga" Fanta!), e a Thaizinha, por tanta coisa que eu teria que começar a escrever outra tese.

Ao super-Gonça (Gongon), amigão de todas as horas, por tudo!

Ao Fernandinho, pela ajuda direta neste trabalho, por muitas discussões produtivas e pela amizade.

Ao Xiko (Chiquinho de Jesus), pela força e amizade.

\`A internacional Marymar, e a grande Maria Helena por toda a força, apoio e amizade.

\`A Claudinha e Ana Lúcia, pela amizade , excelente convivência e por todas as vezes que nao me deixaram perder a hora de acordar.

\`A Silvana Buzato, cuja amizade e apoio foram imprescindíveis em muitas ocasioes.

\`A Silvia Gandolfi, pela amizade e ótimo período em que moramos juntas.

\`A Fabi, pelo apoio e força .

\`A Cris, que apesar da pouca convivência, já é considerada amigaça, pela grande força que me deu neste período.

Ao amigo Otávio Rab Lage, Paulo Zoppi e Wagner Zanetti, por tudo!

\`A minha amiga ("eletrônica", por enquanto, via "mail") Helaine Carrer, por tudo que tem feito por mim e pelo apoio à distância.

\`As minhas tias Zoca (Marisa), Lu, Miryan, Maida e Marieta, pelo que fizeram por mim.

E, finalmente:

Ao Thó, por tudo!!!!!!! Todo o apoio, carinho, conselhos profissionais e pelo estímulo à parte para a conclusão dessa tese.

Aos meus pais, irmãos - Duda, Caco e Nando - e avós, a quem dedico este trabalho, pela compreensão, pelo incentivo, pelo apoio, pelo carinho, pela torcida, pela paciência, enfim, por terem me ajudado a chegar até esse ponto , contribuindo para isso de todas as maneiras possíveis .

ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS	3
REVISAO DE LITERATURA	5
1. O GÊNERO <i>XANTHOMONAS</i>	7
2. GENES ENVOLVIDOS NA PATOGENICIDADE	
2.1. Estratégias utilizadas para a identificação de genes de patogenicidade.....	8
2.2. Fatores envolvidos na patogenicidade....	10
2.3. Classificação dos genes de patogenicidade.....	16
3. <i>XANTHOMONAS CAMPESTRIS</i> PV. <i>VESICATORIA</i>	
3.1. Genes de avirulência.....	17
3.2. Genes <i>hrp</i> - <i>hypersensibility response</i> and <i>pathogenicity</i>	21
3.3. Genes <i>dsp</i> (<i>disease specific</i>).....	24
4. GENES DE ESPECIFICIDADE AO HOSPEDEIRO.....	25

MATERIAL E MÉTODOS

1. LINHAGENS BACTERIANAS E PLASMÍDIOS.....	29
2. PLANTAS UTILIZADAS.....	32
3. MEIOS DE CULTURA E ANTIBIÓTICOS.....	32
4. INDUÇÃO DE MUTAÇÃO	
4.1. Mutagênese com nitrosoguanidina (NTG)...	35
4.2. Mutagênese com ultravioleta.....	36
5. ISOLAMENTO DE MUTANTES NAO PATOGÊNICOS	
5.1. Testes de patogenicidade.....	37
5.1.1. Teste em "seedling".....	37
5.1.2. Teste em "seedlings" seccionados.....	39
5.1.3. Teste em planta adulta.....	39
5.1.4. Teste em sementes.....	40
5.1.5. Teste em hipocótilo.....	42
6. CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTES NAO PATOGÊNICOS	
6.1. Crescimento em meio mínimo.....	43
6.2. Produção de enzimas extracelulares.....	43
6.3. Curva de crescimento.....	44
6.4. Teste de hipersensibilidade em plantas não hospedeiras.....	45

7. CONSTRUÇÃO DO BANCO GENÔMICO DE <i>Xcv</i> 317	
7.1. Extração de DNA total de <i>Xcv</i> 317.....	46
7.2. Extração de DNA do vetor.....	46
7.3. Digestão do DNA com enzima de restrição	47
7.4. Defosforilação do vetor.....	47
7.5. Purificação do DNA digerido.....	47
7.6. Ligação do DNA do inserto/vetor.....	48
7.7. Transformação.....	48
7.8. Estoque do banco em glicerol.....	49
7.9. Cálculo da representatividade do banco genômico.....	49
8. COMPLEMENTAÇÃO DO MUTANTE COM O BANCO	
8.1. Conjugação.....	50
8.2. Seleção de transconjugantes quanto à patogenicidade.....	51
8.3. Extração de plasmídio.....	51
8.4. Análise dos clones quanto ao tamanho do inserto.....	51
9. CONJUGAÇÃO DA LINHAGEM 289/NAL ^r DE <i>Xanthomonas</i> <i>campestris</i> pv. <i>manihotis</i> (<i>Xcma</i>) COM O BANCO GENÔMICO DE <i>Xcv</i> 317.....	52

RESULTADOS

1. INDUÇÃO DE MUTAÇÃO
 - 1.1. Mutagênese por NTG (nitrosoguanidina)..53
 - 1.2. Mutagênese por luz UV.....54

2. ISOLAMENTO DE MUTANTES NAO PATOGÊNICOS
 - 2.1. Teste em "seedlings".....56
 - 2.2. Testes em folhas de plantas adultas....63
 - 2.3. Seleção final de mutantes não patogênicos
 - 2.3.1. Teste em "seedlings".....66
 - 2.4. Teste em sementes.....67

3. CARACTERIZAÇÃO DOS MUTANTES
 - 3.1. Crescimento em meio mínimo.....71
 - 3.2. Produção de enzimas extracelulares.....71
 - 3.3. Curva de crescimento.....72
 - 3.4. Hipersensibilidade.....72

4. CONSTRUÇÃO DO BANCO GENÔMICO DE *Xcv* 317 NO VETOR pUFRO27.....74

5. COMPLEMENTAÇÃO DO MUTANTE NAO PATOGÊNICO 7/24 DE *Xcv* 479/NAL COM O BANCO GENÔMICO DE *Xcv* 317.....77

6. COMPLEMENTAÇÃO DE UMA LINHAGEM DE <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>manihotis</i> COM O BANCO GENÔMICO DE <i>Xcv</i> 317.....	84
---	----

DISCUSSÃO

1. INDUÇÃO DE MUTAÇÃO.....	94
2. ISOLAMENTO DE MUTANTES NAO PATOGÊNICOS	96
3. CARACTERIZAÇÃO DOS MUTANTES.....	101
4. CONSTRUÇÃO DE UM BANCO GENÔMICO DE <i>Xcv</i> 317..	103
5. COMPLEMENTAÇÃO DO MUTANTE NAO PATOGÊNICO 7/24 DE <i>Xcv</i> 479/NAL ^r E DA LINHAGEM 289/NAL ^r DE <i>Xcma</i> COM O BANCO GENÔMICO DE <i>Xcv</i> 317	
5.1. Mutante 7/24.....	105
5.2. <i>Xcma</i> 289/Nal ^r	110
CONCLUSÕES.....	117
PERSPECTIVAS.....	121
RESUMO.....	124
ABSTRACT.....	126
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	128

INTRODUÇÃO

Doenças em plantas podem ser definidas como um processo de mau funcionamento de células e tecidos, decorrentes de uma irritação contínua por algum agente patogênico ou fator ambiental. Isso leva ao desenvolvimento de sintomas, podendo resultar em deterioração ou morte da planta ou de suas partes (Agrios, 1989). Entre os agentes patogênicos encontram-se diversos organismos, principalmente fungos, bactérias e vírus, que levam a perdas consideráveis na produção agrícola mundial.

A mancha bacteriana, doença que ataca folhas e de tomate e pimentão, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*), pode levar a sérias perdas na produção dessas colheitas, especialmente em áreas tropicais e subtropicais. Esse patógeno causa danos em frutos, também, inviabilizando-os comercialmente.

Estudos moleculares da interação patógeno-planta têm se intensificado nos últimos anos, visando elucidar o processo de doença. Têm sido descritas basicamente quatro categorias de genes envolvidos na fitopatogenicidade: genes de avirulência (*avr*), genes de hipersensibilidade e patogenicidade (*hrp*), genes específicos de doença (*dsp*) e genes de especificidade ao hospedeiro (*hsv*).

Embora alguns genes envolvidos na fitopatogenicidade tenham sido identificados, os mecanismos através dos quais bactérias causam doença em plantas e como esses genes interagem, ainda são pouco conhecidos.

Em *X. c. pv. vesicatoria*, foram identificados até o presente momento alguns loci de avirulência (Swanson *et al.*, 1988; Ronald & Staskawicz, 1988; Minsavage *et al.*, 1990; Kearney & Staskawicz, 1990b) e de hipersensibilidade (Bonas *et al.*, 1991; Schulte & Bonas, 1992), um único locus *dsp* (Seal *et al.*, 1990) e nenhum do tipo *hsv*.

OBJETIVOS

A mancha bacteriana, causada por *Xcv* em tomate e pimentão, figura entre as principais bacterioses de plantas constatadas no Brasil (Romero, 1985), onde as doenças em plantas podem ocasionar, de modo geral, perdas de 30 - 35% na produção agrícola, havendo casos em que essas perdas chegam ser totais, especialmente quando não são adotadas medidas de controle.(ref.)

No caso dessa doença, as medidas de controle disponíveis não têm se mostrado muito eficazes, desde que consistem na aplicação de antibióticos ou agentes cúpricos, levando à seleção de linhagens resistentes.

Dado o grande valor econômico da cultura do tomate, que é uma das espécies de hortaliças de maior consumo, além de ser a principal hortaliça industrializada no mundo e no Brasil, um método mais eficaz para o controle dessa bacteriose se faz necessário.

A elucidação dos processos envolvidos na fitopatogenicidade poderá levar ao desenvolvimento de novas medidas de controle dessa doença, mais eficazes e economicamente mais viáveis do que as disponíveis atualmente.

Em vista a esses fatos e ao pouco conhecimento existente sobre os mecanismos de patogenicidade de *X. c. pv. vesicatoria*, o presente trabalho teve por

objetivo a identificação de genes da bactéria envolvidos nesse processo, através dos seguintes passos:

a) isolamento e caracterização de mutantes não patogênicos de *Xcv* induzidos por nitrosoguanidina (NTG) e luz ultravioleta (UV);

b) construção de um banco genômico de *Xcv*;

c) conjugação de mutantes não patogênicos com o banco genômico, para identificação de sequências capazes de complementar a mutação;

d) conjugação do banco genômico de *Xcv* com uma linhagem de *X. campestris* de patovar não patogênico para tomate, na tentativa de se identificar algum gene envolvido na determinação de especificidade ao hospedeiro.

REVISAO DE LITERATURA

As doenças em plantas podem ser causadas por fatores ambientais ou patógenos específicos. Entre os fitopatógenos, os principais causadores de doença são fungos, bactérias, micoplasmas, vírus, protozoários, nematóides e plantas superiores parasitas.

Bactérias foram descritas como agentes infecciosos em plantas pela primeira vez em 1878, por Burril, que relacionou a queima (fire blight) de pera e maçã com a presença de bactérias. Posteriormente, E. F. Smith, a partir de 1895, estudando numerosas doenças como murchas de cucurbitáceas, solanáceas e crucíferas, estabeleceu definitivamente o papel de bactérias como fitopatógenos. Além disso, Smith foi o primeiro a descrever, em 1907, a galha da coroa (crown gall) causada por *Agrobacterium*, considerando inclusive a semelhança entre os sintomas da doença e tumores cancerosos em animais.

Esses foram alguns dos trabalhos pioneiros no campo da fitobacteriologia. Atualmente, dentre as aproximadamente 1600 espécies de bactérias descritas, cerca de 80 são reconhecidas como fitopatógenos. Algumas destas são subdivididas em muitos patovares ou subespécies, que diferem de acordo com as espécies de planta que infectam.

Atualmente, as bactérias fitopatogênicas dividem-se basicamente em quatro grupos principais:

1. Bactérias Gram-negativas aeróbicas, que incluem duas das principais famílias de bactérias que interagem com plantas - Família Pseudomonadaceae, que inclui os gêneros *Pseudomonas*, *Xanthomonas* e *Xylella* e Família Rhizobiaceae, onde se situa o gênero *Agrobacterium*.

2. Bactérias Gram-negativas anaeróbicas facultativas, incluindo a Família Enterobacteriaceae, com o gênero *Erwinia*.

3. Bactérias Gram-positivas, incluindo os gêneros *Clavibacter*, *Rhodobacter* e *Cartobacterium*, antes agrupados num único gênero, *Corynebacterium*.

4. Bactérias filamentosas, representadas pelo gênero *Streptomyces*.

Essa classificação baseia-se em dados citados por Agrios (1989) e Daniels (1989).

1. O GÊNERO *Xanthomonas*

Bactérias do gênero *Xanthomonas* apresentam-se em forma de bastonetes, com colônias amarelas devido ao pigmento xantomonadina, exclusivo do gênero, possuem um flagelo polar que lhes garante a motilidade, sendo estritamente aeróbicas e a maioria de crescimento lento (Leyns et al., 1984; Agrios, 1989).

São encontradas apenas em associação com plantas ou material vegetal, constituindo-se basicamente de fitopatógenos e dividindo-se em cinco espécies: *X. albilineans*, *X. ampelina*, *X. axonopodis*, *X. fragariae* e *X. campestris* (Dye & Lelliot, 1974).

Leyns et al. (1984), baseando-se em levantamento de literatura e trabalho experimental, demonstraram que bactérias pertencentes a esse gênero causam doenças em pelo menos 124 espécies de monocotiledôneas e 268 espécies de dicotiledôneas, através de lesões necróticas em folhas, caules e frutos, murchas, maceração de tecido e hiperplasias .

Xanthomonas campestris é a espécie mais complexa e estudada do gênero, tanto com relação à patogenicidade - dado que é responsável pela maioria das doenças acima relacionadas - quanto pela produção de um exopolissacarídeo de ampla aplicação industrial, a goma xantana (Jeanes, 1961). Essa espécie foi dividida em 125 patovares, segundo consta no Bergey's Manual

(Bradbury et al., 1984) e atualmente, foi proposta por Vauterin et al. (1990) uma nova classificação em 143 patovares.

Nos últimos anos, estudos moleculares dos mecanismos de patogenicidade bacteriana vêm aumentando e vários tipos de genes envolvidos na interação bactéria-planta foram identificados. Estes serão abordados em maior detalhe a seguir.

2. GENES ENVOLVIDOS NA PATOGENICIDADE

2.1. Estratégias utilizadas para identificação de genes de patogenicidade

A abordagem mais utilizada no estudo da interação bactéria planta a nível molecular tem sido a obtenção de mutantes que tenham sofrido alteração na expressão de alguma função ligada à patogenicidade e complementação do mesmo com banco genômico de bactéria selvagem.

Diferentes estratégias têm sido utilizadas na obtenção de mutantes não patogênicos: mutagênese química (Daniels et al., 1984; Bonas et al., 1991; Hwang et al., 1992), fago Mu (McCammon et al., 1985), transposons (Anderson & Mills, 1985; Cuppels, 1986; Shaw et al., 1988; Swarup et al., 1991; para revisão, ver

Mills, 1989), mutagênese sítio dirigida por "marker-exchange" (Ried & Collmer, 1988; Schell *et al.*, 1988).

Outra estratégia que vem sendo utilizada de forma crescente é a identificação de genes induzidos pela planta, seguida da investigação de seu papel na patogenicidade (Osbourn *et al.*, 1987; Beaulieu & Van Gijsegem, 1990; Kamoun & Kado, 1990).

Osbourn *et al.* (1987) desenvolveram um método onde fragmentos de DNA cromossômico de *X. c. pv. campestris* foram clonados em um plasmídio "promotor-probe" carregando o gene da cloranfenicol acetiltransferase sem o promotor. Esse banco foi transferido para a linhagem selvagem, e as colônias resultantes foram testadas em "seedlings" tratados com cloranfenicol, permitindo a identificação dos clones carregando promotores induzidos pela planta, pois só cresceram as bactérias onde o promotor do gene de resistência ao antibiótico houvesse sido ativado. Os clones contendo esses promotores foram isolados e utilizados para identificar clones em um banco genômico, que foram investigados posteriormente quanto à patogenicidade.

Beaulieu & Van Gijsegem (1990) utilizaram-se de outra técnica, através de um gene "reporter" sem o promotor, neomicina fosfotransferase, em experimentos com *Erwinia chrysanthemi*, de forma a causar fusão do gene reporter com promotores dessa bactéria,

conferindo resistência à canamicina nas situações em que o promotor estiver se expressando. Dessa forma, os mutantes obtidos por fusão foram selecionados em placas de meio mínimo contendo extratos de planta e canamicina, e os clones que cresceram nessas condições foram testados quanto à virulência em plantas. Esses autores demonstraram que, através desse método, foi possível identificar vários genes induzidos pela planta, a maioria dos quais mostrou-se envolvida na expressão da virulência em *E. chrysanthemi*.

Estudos desse tipo têm possibilitado a identificação de fatores potencialmente ligados à patogenicidade, entre os quais podem ser destacados enzimas extracelulares envolvidas na degradação de compostos de tecido vegetal, exopolissacarídeo, toxinas, fatores reguladores do crescimento, além de genes que complementaram mutantes não patogênicos cujo produto codificado ainda não foi identificado.

2.2. Fatores envolvidos na patogenicidade

Entre os fatores citados acima, as enzimas extracelulares têm-se mostrado especialmente importantes como determinantes de patogenicidade em *Erwinia*. Está bem estabelecido o papel de enzimas pécticas no processo de patogenicidade nesse gênero, tendo sido identificados cinco locus que codificam

pectato liases em *Erwinia chrysanthemi*. Para melhor discussão desse assunto, existem revisões na literatura: Collmer & Keen (1986), Kotoujansky (1987) e Daniels (1988). Murata *et al.* (1991) descreveram a clonagem de um locus em *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *sepA*, que controla a produção de pectinas, celulases e proteases, sugerindo que esse gene tenha um papel chave na patogenicidade dessa bactéria.

Em *Pseudomonas solanacearum*, Schell *et al.* (1988) identificaram uma enzima com atividade de poligalacturonase que pode afetar a virulência da bactéria, sem contudo ser essencial para a patogenicidade da mesma. O mesmo foi demonstrado para essa bactéria quanto ao papel de uma celulase na patogenicidade (Roberts *et al.*, 1988).

Em *Xanthomonas*, o envolvimento de enzimas extracelulares na patogenicidade tem sido descrito principalmente por pesquisadores do grupo de M. J. Daniels. Esses pesquisadores obtiveram, em 1984, isolamento de mutantes não patogênicos de *X. c. pv. campestris* (Daniels *et al.*, 1984a). No trabalho seguinte (Daniels *et al.*, 1984b), dois dos mutantes isolados foram complementados com um banco genômico de *X. c. pv. campestris* selvagem, sendo que um desses mutantes mostrou-se defectivo quanto à produção de protease, poligalacturonato liase e celulase,

enquanto o outro mostrou deficiência de natureza desconhecida .

Posteriormente, Turner *et al.* (1985) demonstraram que o fragmento de DNA do clone cuja alteração é desconhecida está localizado num "cluster" de cerca de 10.0 Kb. Dow *et al.* (1987) investigaram com maior detalhe essa região, sugerindo seu envolvimento na excreção de algumas enzimas extracelulares de *X.c. pv. campestris* , mediando sua translocação através da membrana externa da bactéria. Esses mesmos autores identificaram a produção de três isoenzimas de poligalacturonato liase em *X. c. pv. campestris* .

Tang *et al.* (1987) mostraram que deficiência em produção de protease afeta levemente a patogenicidade de *Xanthomonas*. Genes para produção de celulase também foram identificados em *Xanthomonas* , por Gough *et al.* (1988), através de expressão em linhagens de *X.c. pv. translucens* não celulolíticas, não demonstrando entretanto papel essencial na patogenicidade.

Dessa forma, esse grupo de pesquisadores demonstrou que *X. c. pv. campestris* mostra atividades pectolítica, celulolítica, proteolítica e amilolítica, e que essas enzimas têm um papel, ainda que não essencial , na patogenicidade dessa bactéria. Mutantes pleiotropicamente defectivos nessas funções ou na excreção dessas enzimas para o meio são não patogênicos (Dow *et al.*, 1989).

Outros genes , como os que controlam a excreção dessas enzimas (genes *out*), demonstraram ter um papel na patogenicidade dessas bactérias. Estudos moleculares com um dos "cluster" desses genes revelaram três *open reading frame* (ORF), das quais duas codificam proteínas com extensivo domínio hidrofóbico , enquanto a outra codifica uma proteína hidrofílica (Dums *et al.*, 1991).

Recentemente, Hu *et al.* (1992) relataram a clonagem e caracterização de um gene requerido para a secreção de enzimas extracelulares. Foi descrito um fragmento de 4.2 Kb que apresenta 3 ORFs sucessivas, entre as quais se identificou a semelhança da sequência de aminoácidos de uma dessas proteínas, de 83.5 KDa, com o gene *pulD* de *Klesbiella*, que sabe-se estar envolvido em processos de secreção.

Apesar dos estudos a nível molecular estarem relativamente avançados em *X. c. pv. campestris* , não se tem muita informação sobre a produção de enzimas extracelulares por outros patovares de *X. c. pv. campestris* e sua relação com o processo patogênico. Gholson & Essenberg (1986) demonstraram que mutantes de *X. c. pv. malvacearum* , deficientes quanto à produção de protease , não mostraram alterações quanto à patogenicidade em plantas de algodão.

Em *X. c. pv. vesicatoria*, Seal *et al.* (1990) descreveram o isolamento de um mutante não patogênico

que produz normalmente as enzimas extracelulares discutidas acima.

Beaulieu *et al.* (1991) apresentaram um interessante estudo quanto à produção de enzimas pécticas por *X. c. pv. vesicatoria*, com enfoque populacional. Os autores compararam a capacidade de produção de pectinas por linhagens de *Xcv* procedentes de diversas regiões do mundo, inclusive Brasil e Austrália, e demonstraram que ocorre variação quanto à porcentagem de linhagens produtoras da enzima de acordo com cada região estudada. Esse estudo demonstrou também que, em *Xcv*, esse gene não tem nenhum papel aparente na patogenicidade.

2.3. Classificação dos genes de patogenicidade

Baseado no conhecimento disponível acerca dos mecanismos moleculares de fitopatogenicidade, propôs-se uma classificação dos tipos de genes envolvidos na patogenicidade. Nessa classificação consideram-se quatro grupos de genes:

1. *hrp* - *hypersensitive response and pathogenicity* - genes responsáveis pela patogenicidade em plantas hospedeiras e indução de reação de hipersensibilidade em plantas não hospedeiras.

2. *dsp* - *disease-specific* - genes responsáveis pela patogenicidade mas que não têm função na indução de hipersensibilidade em não hospedeiros.

3. *avr* - *avirulence* - genes que conferem especificidade entre interações raça-cultivar. São genes dominantes e restringem a gama de hospedeiros das bactérias dependendo da presença de genes de resistência nos cultivares.

4. *hsv* - *host-specific virulence* - genes que foram isolados de bactérias com amplo espectro de hospedeiros e são requeridos para a patogenicidade apenas em algumas das plantas hospedeiras.

Uma discussão mais detalhada desses conceitos e até modelos teóricos de como esses genes devem agir no processo patogênico podem ser encontrados em algumas revisões (Gabriel, 1986; Keen & Staskawicz, 1988; Keen, 1990; Gabriel & Rolfe, 1990; Willis *et al.* , 1991).

3. *XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV VESICATORIA*

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* é o agente causal da mancha bacteriana em tomate (*Lycopersicon esculentum*) e pimentão (*Capsicum annum*). Esse patógeno causa danos consideráveis a folhas e caules, especialmente em "seedlings", embora a doença seja mais notável por seu efeito em frutos.

Nas folhas, os sintomas aparecem como pequenas manchas irregulares, com cerca de 3.0mm, cinza-arroxeadas, com o centro preto e um halo amarelo estreito. As lesões podem coalescer, levando à defoliação ou fazendo com que as folhas pareçam quebradiças. Em frutas verdes, aparecem inicialmente pequenos pontos encharcados, levemente salientes, com halos amarelados, atingindo de 3-6mm. Em seguida, os halos desaparecem e as manchas se tornam marron escuras, levemente afundadas, com uma superfície irregular, corticosa, lembrando crateras escurecidas (Agris, 1989; Robbs, 1985).

As folhas podem tornar-se infectadas através de estômatos e ferimentos, e os frutos através de ferimentos.

3.1. Genes de avirulência

Xcv tem sido extensivamente estudada a nível molecular. Os primeiros trabalhos envolvendo clonagem de genes desse patógeno foram na identificação de genes *avr*, determinantes de especificidade ao hospedeiro a nível de raça-cultivar.

Em *Xcv*, existe uma divisão em raças distintas, de acordo com a capacidade de indução de sintomas ou reação de hipersensibilidade em plantas de tomate e em diferentes cultivares de pimentão. A resistência da planta a um patógeno depende da interação entre genes específicos de ambos, manifestando-se quando um gene dominante de resistência da planta interage com um gene dominante de avirulência do patógeno (Coplin, 1989).

Foram descritos três genes de resistência a *Xcv* em pimentão. O gene *Bs1* controla a resposta de hipersensibilidade a linhagens de *Xcv* da raça 2, que contêm o gene de avirulência *avrBs1*. Os genes *Bs2* e *Bs3* interagem com linhagens de *Xcv* da raça 1, que expressam, respectivamente, os locus *avrBs2* e *avrBs3* (Coplin, 1989).

Dalhbeck & Stall (1979) descreveram a ocorrência de mutações espontâneas determinando mudança de raça, com alteração de fenótipo de avirulento para virulento, em alta frequência (4.0×10^{-4}).

Swanson *et al.* (1988) descreveram a clonagem do gene *avrBs1*, mostrando que este está contido num fragmento de 5.3Kb, e que as mutações descritas por Dalhbeck & Stall (1979) podem ser complementadas pelo gene *avrBs1* selvagem, sugerindo que essas mutações pudessem estar localizadas nesse locus. Posteriormente, Kearney *et al.* (1988) completaram essas informações com a identificação de uma sequência de inserção de aproximadamente 1.2 Kb, que ao se inserir no locus do gene *avrBs1* é responsável por essa alteração de raça da bactéria. O elemento transponível foi chamado IS476, e demonstrou-se que sua posição no genoma em relação ao locus *avrBs1* influencia a indução de hipersensibilidade e crescimento da bactéria na planta (Kearney & Staskawicz, 1990a).

Ronald & Staskawicz (1988), posteriormente, sequenciaram o locus *avrBs1* e determinaram que esse fragmento codifica uma proteína de aproximadamente 50Kda, que seria necessária para a indução de resposta de hipersensibilidade no hospedeiro. Esses autores mostraram que esse locus está situado num plasmídeo conjugativo de aproximadamente 193.0 Kb. Stall *et al.* (1986) já haviam relatado a identificação de um plasmídeo de cerca de 193 Kb em *Xcv* que determinava avirulência e resistência a cobre.

Outro locus de avirulência de *Xcv* que é plasmidial é o *avrBs3*, contido num plasmídeo

conjugativo com cerca de 45.0 Kb. Esse gene foi isolado, clonado e sequenciado , demonstrando que uma região de 3.6 - 3.7 Kb é essencial para a sua atividade. Foi encontrado, por sequenciamento de DNA, uma ORF que codifica uma proteína de aproximadamente 125 KDa, aparentemente suficiente para a atividade desse gene. Uma segunda ORF foi identificada na outra fita (Bonas *et al.*, 1989). Em trabalho posterior, Knoop *et al.* (1991) relataram a identificação do promotor de *avrBs3* e demonstraram que esse gene é expresso constitutivamente. Foi identificada uma proteína de 122 KDa , expressa intracelularmente, e com a utilização de anticorpos específicos contra essa proteína, os autores identificaram proteínas homólogas em outros patovares de *X. campestris*.

O terceiro locus de avirulência descrito em *Xcv* , *avrBs2* , é cromossômico e demonstrou-se, através de hibridização, que é altamente conservado entre vários patovares de *X. campestris* . Foi sugerido, dado que mutantes para essa função tiveram sua virulência reduzida, que esse gene é necessário para a expressão total da virulência do patógeno, por mecanismos ainda desconhecidos. A ampla disseminação desse locus entre os diversos patovares de *Xanthomonas* tem criado perspectivas quanto ao uso do gene de resistência correspondente, *Bs2* , no controle de várias doenças causadas por esse gênero em diferentes plantas, por

introdução do gene de resistência na planta (Kearney & Staskawicz, 1990b).

Os genes *avr* descritos acima foram isolados a partir de bactérias do grupo *XcvPT*, segundo classificação de Reifshneider et al. (1985), que propuseram a divisão de *Xcv* em três grupos, de acordo com a virulência para tomate e/ou pimentão, sendo eles: *XcvT*, virulenta somente em tomate; *XcvP*, virulenta apenas em pimentão; *XcvPT*, virulenta para ambos os hospedeiros.

Minsavage et al. (1990) descreveram a clonagem de um quarto gene de avirulência em *Xcv*, responsável por determinar reação incompatível com cultivares de pimentão, permitindo reação compatível da bactéria apenas com plantas de tomate. Este locus foi localizado em plasmídio e designado *avrBsT*.

Canteros et al. (1991), em trabalho posterior, identificaram o locus *avrBsP*, um quinto locus de avirulência em *Xcv*, que apresenta reação compatível com pimentão, mas não com tomate. Esse gene demonstrou homologia com o gene *avrBs3*, na região de 1.7 Kb necessária para sua funcionalidade.

Genes de avirulência têm sido descritos em outros patovares de *Xanthomonas*, como *malvacearum* (Gabriel et al., 1986; De Feyter & Gabriel, 1991) e *oryzae* (Kelemu & Leach, 1990; Reimers & Leach, 1991).

3.2. Genes *hrp* - hypersensibility response and pathogenicity

A reação de hipersensibilidade é uma reação de defesa local da planta, acompanhada por rápida necrose do tecido infectado. É induzida por microorganismos fitopatogênicos, cujo crescimento cessa durante a reação. A hipersensibilidade ocorre quando se estabelecem as chamadas interações incompatíveis envolvendo patógeno-não hospedeiro, ou patógeno-cultivar resistente (Klement, 1982).

A indução de resposta de hipersensibilidade em não hospedeiros tem sido correlacionada à presença de genes *hrp* - designação proposta por Lindgren *et al.* (1986) para genes que apresentam função nas interações compatível com o hospedeiro (patogenicidade) e incompatível (hipersensibilidade) com não hospedeiros. Tem sido mostrado que esses genes estão contidos em largos "clusters" no genoma de vários fitopatógenos.

Genes que se enquadram nessa classificação foram identificados em *Pseudomonas* por vários autores (Niepold *et al.*, 1985; Boucher *et al.*, 1987; 1988; Huang *et al.*, 1990). Bauer *et al.* (1991) demonstraram a existência de um "cluster" de cerca de 40.0 Kb em *Erwinia amylovora*, que apresentou homologia com sequências *hrp* de *P. syringae*. Homologia foi também detectada entre o "cluster" de *P. solanacearum* e vários

patovares de *Xanthomonas campestris* testados, embora isso não tenha sido identificado com relação aos genes *hrp* de *P. syringae* (Boucher *et al.*, 1987).

Em *Xanthomonas*, o primeiro locus *hrp* foi isolado de *X. c. pv. campestris* por Kamoun & Kado (1990). Demonstrou-se que esse locus está contido num "cluster" de aproximadamente 11.0 Kb.

Bonas *et al.* (1991) isolaram genes *hrp* de *X. c. pv. vesicatoria*, demonstrando que seis locus *hrp*, designados *hrp A* a *hrp F*, encontram-se organizados num "cluster" de cerca de 25.0 Kb. Os autores demonstraram também que essa sequência hibridizou com vários patovares de *X. campestris* estudados, o mesmo não ocorrendo quanto às espécies de *Pseudomonas* investigadas.

Schulte & Bonas (1992) estudaram a expressão desses genes de *Xcv* através de experimentos envolvendo hibridização de RNA. O crescimento da bactéria em meio de cultura complexo ou meio mínimo não induziu a expressão desses genes, o que foi um contraste com o observado *in planta*, onde foram detectados níveis elevados de expressão. Esses autores demonstraram que filtrados de culturas de suspensões celulares de plantas de tomate, tabaco e pimentão estimularam a expressão desses genes, e identificaram uma molécula indutora com massa molecular menor que 1.0 KDa. Estudos quanto à expressão de genes *hrp* têm sido desenvolvidos

também em *P. s. pv. syringae* (Xiao *et al.*, 1992) e *E. amylovora* (Wei *et al.*, 1992). Num estudo mais recente, Fenselau *et al.* (1992) fizeram uma análise de sequenciamento de três dos locus *hrp* de *Xcv*. Foi encontrada forte similaridade entre proteínas Hrp de *Xanthomonas* e proteínas de *Yersinia*, *S. flexneri*, *B. subtilis*, *S. typhimurium* e *C. crescentus*. Gough *et al.* (1992) fizeram observações semelhantes em *P. solanacearum*. Baseados nas funções dessas proteínas homólogas de Hrp, os autores propuseram um modelo de funcionamento desses genes, segundo o qual pelo menos parte dos genes *hrp* organizados no "cluster" de *Xcv* devem fazer parte de um sistema de secreção requerido para a patogenicidade em *Xanthomonas*. O paralelo estabelecido entre vias de secreção de microorganismos patógenos de animais e vegetais, devido à natureza altamente conservada de proteínas envolvidas no processo, pode sugerir que vias gerais de patogenicidade possam ter sofrido adaptação para funcionar como parte de um mecanismo de patogenicidade mais específico desenvolvido por cada microorganismo.

Genes *hrp* foram identificados em *X. c. patovares campestris* e *vitians*. Em *X. c. pv. campestris*, foi demonstrado que a sequência que contém esses genes localiza-se numa região de cerca de 25.0 Kb, sendo sugerida a existência de, pelo menos, dois grupos de genes *hrp* regulados diferentemente.

Apesar dos estudos de genes *hrp* estarem avançando rapidamente, ainda se desconhece a função dos genes identificados até o momento.

3.3. Genes *dsp* (disease specific)

São poucos os genes *dsp* descritos na literatura. Além disso, muitas vezes os autores não usam esse critério de classificação para os genes de patogenicidade, dificultando a organização dos dados disponíveis .

Genes *dsp*, ou específicos de doença, receberam essa designação para diferenciá-los dos genes *hrp*, dado que estão envolvidos na determinação de virulência com o hospedeiro, mas não têm função na determinação de resposta de hipersensibilidade em não hospedeiros.

Em *X. c. pv. vesicatoria* foi descrito apenas um gene *dsp* até o momento (Seal et al.,1990). Esses autores, através de mutagenese com Tn5, isolaram um mutante não patogênico que induziu reação de hipersensibilidade em tabaco. Esse mutante foi complementado com um banco genômico da linhagem selvagem , permitindo a identificação de uma região de 22.0 Kb envolvida na patogenicidade de *Xcv*. Não foram relatadas análises de sequenciamento, nem determinação do produto gênico ou função desse locus, até o momento.

Arlat *et al.* (1991) isolaram um locus de *P. solanacearum* que complementou uma mutação do tipo *dsp*. Esse locus foi localizado numa região de cerca de 15.0 Kb, contendo genes que modulam a virulência ao hospedeiro. Esses autores demonstraram que três mutantes *dsp* isolados através de mutagênese com Tn5 têm as inserções do transposon espalhadas pelo genoma, em regiões distintas.

Apesar da velocidade com que o conhecimento com relação à genética da fitopatogenicidade vem aumentando nos últimos anos, questões como a função de cada gene, os produtos gênicos envolvidos, a interação entre os mesmos, permanecem por ser esclarecidos.

4. GENES DE ESPECIFICIDADE AO HOSPEDEIRO

A determinação de especificidade patógeno-hospedeiro tem sido investigada por outros autores. Encontra-se bem estabelecido para *Xcv* um sistema de reconhecimento patógeno hospedeiro a nível de raça - cultivar, através dos genes de avirulência, como descrito acima. Considera-se que esses genes agem negativamente na determinação da especificidade ao hospedeiro, no que se refere ao patógeno, desde que restringem o seu número de hospedeiros (Keen & Staskawicz, 1988).

Entretanto, existem relatos de ocorrência de determinantes positivos da interação planta-patógeno. Isso está melhor documentado para *Agrobacterium tumefaciens*. Em outros gêneros, existem poucos trabalhos disponíveis quanto a esse tipo de gene.

Em *Pseudomonas solanacearum*, loci envolvidos na determinação de especificidade ao hospedeiro foram descritos por Ma *et al.*, 1988.

Quanto a *Xanthomonas*, Melano & Cooksey (1988) isolaram mutantes de *X. c. pv. translucens* afetados na especificidade ao hospedeiro. Esse patógeno causa estrias foliares em cereais e gramíneas, e ataca diversos hospedeiros. Esses autores descreveram que, após tratamento com EMS (etil metano sulfonato), houve uma diminuição da gama de hospedeiros susceptível a esse patógeno. As mutações fizeram com que a bactéria fosse capaz de afetar alguns, mas não todos os hospedeiros, demonstrando que a mutação não foi em genes de patogenicidade básica. Os autores sugeriram que genes específicos são requeridos para que a bactéria ataque cada hospedeiro.

Waney *et al.* (1991) relataram, posteriormente, a identificação de genes *hsv* de *X.c. pv. translucens*. Foram obtidos mutantes afetados quanto à interação com apenas um dos hospedeiros, mas que demonstraram interação compatível com todos os demais. Foram obtidos mutantes alterados para cada hospedeiro,

separadamente. Esse é o primeiro relato de identificação de genes *hsv* em *Xanthomonas*. Demonstrou-se que esses genes diferem funcionalmente dos *hrp*, desde que não estão envolvidos na indução de reação de hipersensibilidade em não hospedeiros e nem são requeridos no processo de virulência das plantas que não se constituam seu hospedeiro específico. Esses genes diferem também dos *avr*, por agirem positivamente e não demonstrarem especificidade a nível de raça-cultivar. Foi demonstrada uma analogia funcional em relação aos genes de nodulação hospedeiro-específica (*hsn*) de *Rhizobium*. Foi sugerido que essa classe de genes possa ser responsável pela determinação da gama de hospedeiros de um patógeno a nível de gênero e talvez espécies de plantas.

Sawczyc *et al.* (1989) relataram a transferência de um banco genômico de *X. c. pv. campestris* (*Xcc*) para *X. c. pv. translucens* (*Xct*), e vice-versa. Os transconjugantes foram testados em trigo e nabo, de forma que clones de *Xcc* contendo o banco genômico de *Xct* fossem inoculados em trigo, para verificar a ocorrência de alteração de especificidade ao hospedeiro a partir da introdução de DNA de *Xct*, e clones de *Xct* contendo o banco de *Xcc* fossem inoculados em nabo, com o mesmo fim. Nos dois casos, não houve o aparecimento de plantas doentes, demonstrando que não ocorreu alteração de especificidade ao hospedeiro.

Os estudos moleculares de fatores envolvidos na determinação de especificidade ao hospedeiro em *Xanthomonas* estão começando a emergir, abrindo perspectivas para o desenvolvimento de muitas pesquisas nessa área.

MATERIAL E METODOS

1. LINHAGENS BACTERIANAS E PLASMÍDIOS

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

Tabela 1 - Linhagens bacterianas

Linhagem	Características	Fonte ou referência
<i>Xanthomonas</i>		
<i>Xcv</i>	Patógeno de tomate	
479/Nal	Mutante espontâneo derivado linhagem 479 (IB), Nal ^r .	Este Laboratório
317	Tipo selvagem	Instituto Biológico (IB)
7/21	Mutante não patogênico (pat ⁻) derivado de <i>Xcv</i> 479/Nal ^r obtido após tratamento com NTG	Este trabalho
7/24	Mutante pat ⁻ derivado de <i>Xcv</i> .479 Nal ^r , obtido após tratamento com NTG	Este trabalho
8/31	Mutante pat ⁻ derivado de <i>Xcv</i> . 479 Nal ^r , obtido após tratamento com NTG	Este trabalho
16/14	Mutante pat ⁻ derivado de <i>Xcv</i> 479/Nal ^r , obtido após tratamento com UV	Este trabalho
<i>Xcma</i>		
289	Tipo selvagem	Instituto Biológico (IB)
289/Nal	Mutante espontâneo derivado da linhagem 289, Nal ^r	Este trabalho
<i>Escherichia coli</i>		
DH5a	<i>supE44 lacU169(φB01lacZM15)</i> <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96</i> <i>thi-1 relA1</i>	Bethesda Research Laboratories

Tabela 2 - Plasmídios			
Plasmídio	Características	Fonte ou referência	
pUFRO27	Incl ^w , M ^{or} , Mob ⁺ , MobP, JacZ ⁺ , Par ⁺	De Feyter et al., 1990.	
pVE7241	pUFRO27 + fragmento EcoRI de 4.0Kb de DNA genômico de Xcv 317	Este trabalho	
pVE7242	pUFRO27 + fragmento EcoRI de ~4.0Kb de DNA genômico de Xcv 317	Este trabalho	
pVE7243	pUFRO27 + fragmento EcoRI de ~3.0Kb de DNA genômico de Xcv 317	Este trabalho	
pVE7244	pUFRO27 + fragmento EcoRI de ~5.0Kb de DNA genômico de Xcv 317	Este trabalho	
pVEMA71	pUFRO27 + fragmento EcoRI de ~2.3Kb de DNA genômico de Xcv 317	Este trabalho	
pVEMA73	pUFRO27 + fragmento EcoRI de 2.3Kb de DNA genômico de Xcv 317	Este trabalho	
pVEMA74	pUFRO27 + fragmento EcoRI de ~6.0Kb de DNA genômico de Xcv 317	Este trabalho	
pRK2073	derivado de pRK2013, npt::Tn7, Km ^r , Sp ^r , Tra ⁺ plasmídio "helper"	Leong et al., 1982.	

2. PLANTAS UTILIZADAS

O hospedeiro utilizado neste trabalho para a realização dos testes de patogenicidade foi o tomate (*Lycopersicon esculentum*), cultivar PETOMECH VF 1&2, procedente da Petoseed Co., Inc..

Para os testes de hipersensibilidade, foram utilizadas plantas de *Nicotiana tabacum*, cultivar PETIT HAVANA SR1 (Maliga et al., 1973).

3. MEIOS DE CULTURA E ANTIBIÓTICOS

Os meios de cultura utilizados para crescimento de *Xanthomonas* foram NYGB (meio líquido completo) e NYGA (meio sólido completo) (Turner et al., 1984), que ao longo desta dissertação estão referidos como meio N.

Para a caracterização dos mutantes quanto ao crescimento em meio mínimo, foram utilizados os meios MP1 (Sow e Demain, 1979) e M9 (Maniatis et al., 1982).

A caracterização das linhagens quanto à produção de enzimas extracelulares foi feita através dos meios seletivos citados ou descritos a seguir.

- Meio para detecção de atividade proteolítica (Tang et al., 1987)

- Meio para detecção de atividade amilolítica

Meio NYGA.

Amido solúvel 0.2%

pH 6.0

A revelação foi feita com vapor de iodo, permitindo a visualização dos halos formados pelas colônias positivas.

- Meio para atividade lipolítica (Sierra, G. 1957)

- Meio para detecção de atividade celulolítica

(adaptado de Bocarra et al., 1988)

Meio M9

5.0 g de glicerol

5.0 g de carboximetilcelulose

1.0 g de extrato de levedura

15.0 g de ágar

1000 ml de água destilada

A revelação dos halos foi feita corando-se as placas com Congo-Red 0.1%.

- Meio para detecção de atividade pectolítica (Bocarra et al., 1988, com modificação do substrato utilizado)

Meio M9

5.0 g de glicerol

5.0 g de pectina cítrica

1.0 g de extrato de levedura

15.0 g de ágar

1000 ml de água destilada

A revelação das placas foi feita com hexadeciltrimetil amonium bromide 1%.

O crescimento de *E. coli* foi feito em meio LB (Maniatis et al., 1982) líquido ou sólido (LB + ágar 1,5%).

A cultura *in vitro* das plantas foi feita em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) sólido (com 1% de ágar ou Gelrite).

As concentrações de antibióticos utilizadas em meio sólido foram as seguintes: ácido nalidíxico (Nal), 50 µg/ml; canamicina (Km), 50 µg/ml; espectinomicina (Sp), 50 µg/ml. Em meio líquido , as concentrações utilizadas foram metade das citadas para meio sólido.

4. INDUÇÃO DE MUTAÇÃO

4.1. Mutagênese com nitrosoguanidina (NTG)

O tratamento das bactérias com nitrosoguanidina foi feito segundo metodologia descrita por Adelberg et al. (1965), com a modificação do meio mínimo utilizado no preparo do tampão TM (Tris-maleico), que foi substituído, neste trabalho, pelo meio MP1 (Sow & Demain, 1979).

Foram divididos 5ml de cultura 14 - 16h de *Xcv* 479/Nal^r (30°C, sob agitação) em amostras de 1ml, distribuídas em tubos Eppendorf.

A solução estoque de NTG foi preparada com a adição de 1g de NTG (SIGMA) em 10ml de tampão TM. A solução foi adicionada a cada amostra para uma concentração final de NTG de 10mg/ml.

Os tempos de exposição de cada amostra ao mutagênico foram de 0 min., 15 min., 30 min. e 45 min., respectivamente, após o que as amostras foram centrifugadas e lavadas sucessivamente em tampão, conforme o protocolo.

Ao final do tratamento, as células foram ressuspendidas em solução salina (NaCl 0.9%), diluídas 10³ vezes e plaqueadas em meio N. contendo o antibiótico apropriado (ácido nalidíxico). As placas foram mantidas em estufa a 28°C. As colônias crescidas

isoladamente nas placas foram contadas para a elaboração de uma curva de sobrevivência.

4.2. Mutagênese por luz ultravioleta (UV)

O tratamento com UV foi feito a partir de cultura 14 - 16h de *Xcv* 479/Nal^r. A cultura foi diluída 10³ vezes em solução salina e 10 ml da suspensão bacteriana foram espalhados sobre uma placa de Petri esterilizada, de forma a cobrir completamente o fundo da mesma.

Foi montado um aparato colocando-se dois suportes de madeira de mesma altura (8cm) um de cada lado da placa contendo a suspensão de células, sobre o qual apoiou-se uma fonte de UV (Mineralight Lamp, modelo UVGL - 25, Ultra-Violet Products Inc.). A fonte foi mantida em comprimento de onda - 254 nm .

O tempo de exposição à luz UV variou de 0 segundos (controle) a 80 segundos. Foram coletadas alíquotas de 1ml da suspensão nos seguintes tempos de exposição: 0, 10 , 20, 40 e 80 segundos. Cada alíquota foi diluída e plaqueada como descrito anteriormente para as células tratadas com NTG. As placas foram mantidas em estufa a 28°C e as colônias foram contadas, posteriormente, para a elaboração de curva de sobrevivência.

5. ISOLAMENTO DE MUTANTES NAO PATOGÊNICOS

5.1. TESTES DE PATOGENICIDADE

As linhagens utilizadas como controles positivo e negativo nos testes de patogenicidade efetuados para isolamento de mutantes não patogênicos foram, respectivamente , *Xcv* 479/*Nal*^r e *Xcma* 289.

5.1.1. TESTE EM "SEEDLING"

O primeiro passo do procedimento foi a descontaminação das sementes. A quantidade desejada de sementes foi determinada por peso e colocada em um frasco de vidro contendo 10ml de água esterilizada e uma gota de detergente líquido comum. Após agitação, as sementes foram depositadas numa peneira esterilizada e lavadas várias vezes com solução esterilizada de hipoclorito 5% , até a retirada total do detergente, sendo em seguida lavadas abundantemente em água destilada esterilizada.

As sementes descontaminadas foram distribuídas em fôrmas de minigelo esterilizadas, com 16 x 7 compartimentos de aproximadamente 1cm³ cada. Os 112 compartimentos foram preenchidos com meio de germinação MS (Murashige & Skoog, 1962) contendo 1% de ágar , colocando-se, após o endurecimento do meio, uma semente

por compartimento. As fôrmas foram colocadas em caixas de plástico maiores (29,5cm comprimento x 20,5cm largura x 10cm altura - 1 fôrma/caixa , ou 31cm comp. x 24cm largura x 10cm altura - 2 fôrmas/caixa), previamente descontaminadas com hipoclorito 5% e álcool e cobertas com filme transparente de PVC.

Para a realização de testes em que vários "seedlings" foram inoculados com a mesma linhagem bacteriana, 15 a 20 sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri esterilizadas contendo meio MS. As placas foram mantidas abertas dentro das caixas de plástico já citadas, cobertas com filme de PVC.

Essas caixas foram transferidas para câmaras de germinação da Forma Scientific, com as seguintes condições de crescimento estabelecidas: temperatura 25°C e fotoperíodo de 16h de claro /8h de escuro. Após 4-6 dias, as plantas estavam prontas para o inóculo, que foi feito como especificado por Daniels *et al* (1984), com o auxílio de uma alça de platina tendo uma agulha como ponta. Essa agulha foi esterilizada e tocou a superfície da colônia a ser testada, crescida em meio sólido. O inóculo foi feito por perfuração do caule do "seedling" com a agulha , sendo utilizada uma pinça esterilizada como apoio, por trás do "seedling", para que o caule não se dobrasse.

Após o inóculo, as caixas contendo os "seedlings" infectados foram envoltas em sacos plásticos, dois por

caixa, sobrepostos, de forma a manter a umidade, favorecendo o desenvolvimento de sintomas. Os sintomas foram observados após 5 - 7 dias da inoculação.

5.1.2. TESTE EM "SEEDLINGS" SECCIONADOS

As plantas foram crescidas conforme descrito no item 5.1.1. Após 4 a 5 dias da germinação, os "seedlings" tiveram a metade superior removida com o auxílio de uma tesoura cirúrgica esterilizada.

A extremidade exposta foi inoculada através de raspagem da lesão com um palito previamente mergulhado em colônia de bactéria crescida em meio sólido.

Após o inóculo, as caixas contendo as plantas infectadas foram envoltas em sacos plásticos, conforme descrito, para manutenção de umidade nas mesmas.

Os sintomas foram observados após 4-6 dias do inóculo.

5.1.3. TESTE EM PLANTA ADULTA

As plantas foram crescidas ao ar livre, em sacos plásticos pretos de 1 litro, em terra adubada, por 4 a 6 semanas, após o que foram transferidas para o laboratório, onde foi realizado o inóculo .

O inóculo foi feito a partir de cultura de células crescidas 14 - 16h, diluída 10^1 a 10^3 vezes em solução salina, com o auxílio de uma seringa de 1ml. As seringas, sem as agulhas, foram pressionadas contra a superfície inferior da folha, de forma que a suspensão bacteriana penetrasse no tecido da planta, levando a um encharcamento no ponto de inóculo.

Os ramos contendo as folhas infectadas foram cobertos por um saco plástico transparente vedado com fita adesiva, para conservar a umidade, facilitando a manifestação dos sintomas. As plantas foram mantidas em laboratório. Os sintomas foram observados a partir do terceiro/quarto dia de infecção.

5.1.4. TESTE EM SEMENTES

Neste teste, após a descontaminação das sementes como descrito anteriormente no item 5.1.1, foi feito tratamento das mesmas com cultura das linhagens a serem testadas.

As culturas foram crescidas por 14 - 16h, sob agitação, a 30°C. Em seguida, 40 ml da cultura foram centrifugados por 10 min., 3000 rpm., 4°C. As células precipitadas foram ressuspensas em 20 ml de solução salina, e as diferentes suspensões foram padronizadas para uma mesma concentração celular, através de ajuste da absorbância a 550nm para 0.150.

As sementes foram distribuídas em placas de Petri estéreis , sobre as quais foram despejadas as suspensões correspondentes a diferentes linhagens. As placas foram vedadas com filme de PVC e mantidas sob baixa agitação por 2 - 3 horas em "shaker" orbital, a 30°C, após o que foram transferidas para estufa a 28°C até se completarem 24 h a partir do inóculo.

As sementes tratadas foram distribuídas nas fôrmas de minigelo, em meio MS. Foi deixada uma fileira vazia entre cada controle e a linhagem a ser testada.

As fôrmas foram colocadas em caixas de plástico maiores, cobertas com filme de PVC , sendo transferidas para a câmara de germinação a 28°C, fotoperíodo de 16h de luz/8h de escuro. As caixas foram recobertas por dois sacos plásticos transparentes, para auxiliar na manutenção de umidade.

A observação dos sintomas começou após 9/10 dias de infecção.

5.1.5. TESTE EM HIPOCÓTILO

Para este teste, após a descontaminação as sementes foram distribuídas em fôrmas de minigelo ou placas de Petri contendo meio MS, nas mesmas condições descritas no item 5.1.1.

Após 5 - 7 dias da germinação as caixas de plástico foram abertas em câmara de fluxo laminar e os "seedlings" foram cortados em vários fragmentos com cerca de 1cm , com o auxílio de uma tesoura cirúrgica e pinça esterilizadas. Os fragmentos de hipocótilo foram depositados em placas de Petri esterilizadas.

O inóculo foi feito segurando-se uma das extremidades do fragmento de hipocótilo com uma pinça esterilizada, enquanto a outra extremidade foi mergulhada diretamente em colônia de bactéria crescida em placa. Em seguida ao inóculo, os hipocótilos foram dispostos em placas de Petri contendo meio ágar/água 1%, 20/placa, mantendo-se uma distância mínima de 1cm entre eles para evitar contaminação. A tampa dessas placas foi recoberta internamente com papel de filtro, para evitar que gotas de água formadas na tampa da placa, devido à evaporação , pudessem cair sobre os hipocótilos infectados, causando a contaminação entre diferentes inóculos.

As placas foram mantidas em estufa a 28°C e a observação dos sintomas começou ao terceiro/quarto dia de infecção.

6. CARACTERIZAÇÃO DOS MUTANTES NAO PATOGÊNICOS

6.1. CRESCIMENTO EM MEIO MÍNIMO

Os mutantes identificados a partir dos testes acima descritos foram testados quanto à capacidade de crescimento em meio mínimo

Os meios mínimos utilizados para a verificação de auxo/prototrofia foram o MP1 e o M9 sólidos. As placas foram mantidas em estufa a 28°C por 48h, quando o crescimento foi observado.

6.2. PRODUÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES

As atividades enzimáticas testadas foram: proteolítica, amilolítica, lipolítica, celulolítica e pectolítica. A detecção dessas atividades foi feita através de plaqueamento das colônias em meios seletivos apropriados para a verificação de produção de cada enzima. As placas foram mantidas em estufa a 28°C por 48h, após o que foi feita a revelação necessária para evidenciar a atividade de cada enzima testada. Os meios

seletivos utilizados e a revelação das atividades enzimáticas estão descritos no item 3.

6.3. CURVA DE CRESCIMENTO

O crescimento *in vitro* das colônias mutantes foi monitorado através de medidas da absorbância (Abs) dos meios de cultura, em espectrofotômetro, por leitura a 550nm. Foram feitos pré-inóculos das culturas exatamente 24h antes de ser feito o inóculo e a Abs dos pré-inóculos foi padronizada para 1.0. O inóculo foi feito com adição de 1ml de cultura de pré-inóculo, com a Abs padronizada em 0.6, em 40ml de meio N. líquido contendo o antibiótico ácido nalidíxico.

Imediatamente após o inóculo foram coletadas as primeiras amostras (T=0h). As amostras consistiram de alíquotas de 2ml da cultura, e foram coletadas em intervalos de três horas (duas amostras/cultura/intervalo de tempo), até se completarem 33h do início do crescimento. Os valores médios das medidas de Abs a cada intervalo de tempo foram utilizados na elaboração da curva de crescimento.

6.4. TESTE DE HIPERSENSIBILIDADE EM PLANTA NAO HOSPEDEIRA

Para esse teste foram utilizadas folhas destacadas de *Nicotiana tabacum*.

O inóculo foi feito da mesma forma descrita para teste em folhas de planta adulta (item 5.1.2), por infiltração de suspensão bacteriana, modificando-se apenas a preparação da suspensão, que nesse caso foi a partir de células crescidas em meio sólido. Isso foi feito com o auxílio de uma alça de platina, com a qual as células foram retiradas da placa e inoculadas em solução salina. Após homogeneização das suspensões e padronização das mesmas para 0.6 de Abs procedeu-se a inoculação da folha.

As folhas inoculadas foram mantidas em caixas de plástico forradas internamente com papel de filtro embebido em água esterilizada e cobertas com filme de PVC. As caixas foram envoltas em dois sacos plásticos e mantidas na câmara de germinação. A reação foi observada após 36 - 48h do inóculo.

7. CONSTRUÇÃO DO BANCO GENÔMICO DE *Xcv* 317

7.1. EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DE *Xcv* 317

A extração de DNA total de *Xcv* 317 foi feita através do aparelho Nucleic Acid Extractor 340A, da Applied Biosystems, segundo especificações do fabricante.

O DNA foi recuperado em filtros de membrana, que foram transferidos para tubos Eppendorf contendo tampão TE, pH 8.0 (Maniatis *et al.*, 1982), sendo eluído e estocado a 4°C. Para a eluição do DNA, foram adicionados 100µl de tampão por filtro.

7.2. EXTRAÇÃO DE DNA DO VETOR

O vetor escolhido para a construção do banco genômico foi o plasmídeo pUFR027 (DeFeyter *et al.*, 1990), com 9.3 Kb e resistência a neomicina/canamicina.

A extração de DNA do vetor foi feita a partir de cultura 14 - 16h de *E. coli* DH5a/pUFR027, pelo método de lise alcalina (Birnboim & Doly, 1979), com as modificações descritas em Sambrook *et al.* (1989) para preparação em grande escala.

7.3. DIGESTÃO DO DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

O DNA total de *Xcv* 317 foi digerido 14 - 16h a 37°C, com a enzima EcoRI (BRL), segundo especificações do fabricante. O DNA do plasmídio pUFR027 foi digerido por 4h a 37°C com a enzima EcoRI acima referida.

7.4. DEFOSFORILAÇÃO DO VETOR

O DNA do pUFR027 linearizado com EcoRI foi defosforilado com a enzima BAP (Bacterial Alkaline Phosphatase - BRL), segundo especificações descritas por Sambrook *et al.* (1989).

O sistema de digestão pUFR027/EcoRI foi inativado por aquecimento a 75°C por 10 min. e a fosfatase foi adicionada diretamente ao sistema, na proporção de 1U/micrograma de DNA. Essa segunda reação foi inativada por novo aquecimento a 75°C por 10 min. .

7.5. PURIFICAÇÃO DO DNA DIGERIDO

O DNA total digerido 14 - 16h com EcoRI foi purificado através do kit GeneClean (Bio101 Inc.), segundo especificações do fabricante.

O DNA do plasmídio pUFR027 foi purificado pelo mesmo método, após a defosforilação.

7.6. LIGAÇÃO DO DNA INSERTO/VETOR

O sistema de ligação foi preparado de forma que os fragmentos obtidos com a digestão do DNA total de Xcv 317 com EcoRI e o vetor estivessem numa relação molar de aproximadamente 1:1.

A reação foi efetuada num volume total de 20 μ l, contendo 300ng de DNA de inserto e 300ng de DNA do vetor. A enzima T4 DNA LIGASE (BRL), foi utilizada segundo especificações do fabricante.

7.7. TRANSFORMAÇÃO

A transformação foi realizada utilizando-se células competentes preservadas a -70°C, segundo metodologia descrita por Sambrook et al., 1989.

As células transformadas foram selecionadas por resistência ao antibiótico canamicina, e as colônias contendo inserto foram identificadas por seleção em placas contendo X-gal (5 - bromo - 4 - cloro - 3 - indolil - β - D - galactosídeo) e IPTG (isopropiltio - β - D - galactosídeo), segundo especificações de Sambrook et al. (1989). As colônias brancas foram isoladas e transferidas para placas contendo meio LB sólido acrescido de canamicina.

7.8. ESTOQUE DO BANCO EM GLICEROL

O banco genômico de *Xcv* construído em *E. coli* DH5a foi estocado em glicerol a -70°C .

A amplificação do banco foi efetuada colocando-se 5ml de meio LB líquido em cada placa contendo colônias recombinantes (50/placa). As placas foram vedadas com filme de PVC e colocadas sob baixa agitação em 'shaker' orbital, a 37°C , por 2h, após o que alíquotas de 500 μl foram retiradas de cada placa e transferidas para um Erlenmeyer com 40ml de meio LB líquido contendo canamicina. O total de colônias recombinantes obtidas foi crescido 14 - 16hsob agitação, a 37°C , e alíquotas de 750 μl da cultura foram transferidas para tubos Eppendorf contendo 250 μl de glicerol 60%, de forma a dar uma concentração final de 15% de glicerol.

Os tubos foram estocados em freezer a -70°C .

7.9. CÁLCULO DA REPRESENTATIVIDADE DO BANCO GENOMICO

A representatividade teórica do banco genômico obtido foi calculada segundo cálculo proposto por Clarke & Carbon, 1976

8. COMPLEMENTAÇÃO DO MUTANTE COM O BANCO GENÔMICO

8.1. CONJUGAÇÃO

Foi feita uma conjugação *en masse* do banco genômico de Xcv 317 mantido em *E. coli* DH5a para uma linhagem não patogênica, através de cruzamentos triparentais (Ditta *et al.*, 1980) envolvendo o plasmídio "helper" pRK2073 (Leong *et al.*, 1982).

Foi centrifugado 1ml de cultura 14 - 16h da linhagem receptora em um tubo Eppendorf esterilizado. O sobrenadante foi descartado e 1ml de cultura 14 - 16h de *E. coli* HB101/pRK2073 foi centrifugado no mesmo tubo, formando um segundo sedimento. Descartado o sobrenadante, foi adicionado ao tubo 1ml de cultura 14 - 16h do banco genômico de Xcv, que foi centrifugado e o sobrenadante descartado de forma que cerca de 100µl do líquido permanecessem no tubo. O sedimento final foi ressuspendido nesse líquido residual e a suspensão contendo as linhagens a serem conjugadas foi transferida para uma placa contendo meio N., sem antibiótico.

Após 24h mantidas em estufa a 28°C, foi feita uma suspensão de células com uma alíquota da massa celular da placa, que foi diluída 10^1 - 10^2 vezes em solução

salina e plaqueada em meio N. contendo os antibióticos apropriados para seleção dos transconjugantes.

8.2. SELEÇÃO DE TRANSCONJUGANTES QUANTO À PATOGENICIDADE

A seleção de colônias restauradas quanto ao fenótipo de patogenicidade foi feita através de teste em "seedlings", conforme descrito anteriormente.

Os controles positivo e negativo utilizados nestes experimentos foram, respectivamente, as linhagens 317 e a linhagem não patogênica utilizada como receptora.

8.3. EXTRAÇÃO DE PLASMÍDIO

Os plasmídios foram extraídos pelo método de lise alcalina (Birnboim & Doly, 1979), com as modificações descritas por Maniatis *et al.*, 1982.

8.4. ANÁLISE DE CLONES QUANTO AO TAMANHO DO INSERTO

O DNA de clones positivos quanto à patogenicidade foi digerido com a enzima EcoRI (BRL), segundo especificações do fabricante, para verificação do tamanho do fragmento.

O fragmento liberado com a digestão foi evidenciado através de eletroforese em gel de agarose 0.8%, utilizando-se tampão TAE (Tris/Acetato/EDTA). O

material foi corado com brometo de etídeo (10µg/ml) , visualizados em fonte de luz UV e fotografados com filme Polaroid 667.

9. CONJUGAÇÃO DA LINHAGEM 289/NAL^r DE *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (*Xcma*) COM O BANCO GENÔMICO DE *Xcv* 317

Os passos seguidos nessa etapa foram os mesmos descritos no item 8, exceto quanto ao teste utilizado na seleção de clones positivos quanto à patogenicidade, que nesta etapa foi o teste de hipocótilo.

O mutante resistente a ácido nalidíxico foi isolado através de plaqueamento da linhagem *Xcma* 289 selvagem em meio N. contendo o antibiótico, para seleção de mutante espontâneo de resistência. Colônias isoladas resultantes desse plaqueamento foram estriadas em placas contendo o antibiótico, permitindo sua amplificação.

RESULTADOS

1. INDUÇÃO DE MUTAÇÃO

1.1. Mutagênese por NTG (nitrosoguanidina)

A linhagem de *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* (Xcv) escolhida para ser mutagenizada foi a linhagem 479, com resistência a ácido nalidíxico (Nal), mutante espontâneo da linhagem 479, selecionado neste laboratório.

O tempo de exposição ao mutagênico variou de 0 min. (controle) a 45 min., com amostras coletadas a intervalos de 15 min.. Foi feita a contagem do número de colônias sobreviventes a cada tempo e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3. O número de colônias representa a média obtida da contagem de duas placas de mesma diluição.

Tabela 3 - Número de células obtidas após diferentes tempos de exposição ao NTG (10 mg/ml).

Tempo (minutos)	Número de colônias (por ml)	Porcentagem de sobrevivência
0	$6.05 * 10^5$	100.00
10	$2.90 * 10^5$	47.93
20	$2.45 * 10^5$	40.50
30	$0.25 * 10^5$	4.13

Esses dados permitiram a construção de uma curva de sobrevivência (Figura 1). As colônias que sobreviveram aos 20 e 30 minutos de exposição, com porcentagem de sobrevivência de 40.50 a 4.13%, respectivamente, foram isoladas para serem testadas quanto ao fenótipo de patogenicidade em plantas de tomate, num total de 300 colônias.

As colônias mostraram-se semelhantes morfológicamente, exceto quanto a três colônias brancas, que deixaram de apresentar a coloração amarela característica de *Xanthomonas*.

1.2. Mutagênese por luz UV

Para a mutagênese com UV, a linhagem escolhida foi a mesma citada anteriormente. A exposição ao mutagênico variou de 0 a 80 segundos, com amostras coletadas nos tempos 0, 10, 20, 40 e 80 segundos. Essas amostras foram diluídas e plaqueadas e foi feita a contagem das colônias sobreviventes para cada intervalo de tempo estabelecido.

Os resultados desse experimento são apresentados na Tabela 4, onde o número de colônias representa a média da contagem de duas placas de mesma diluição.

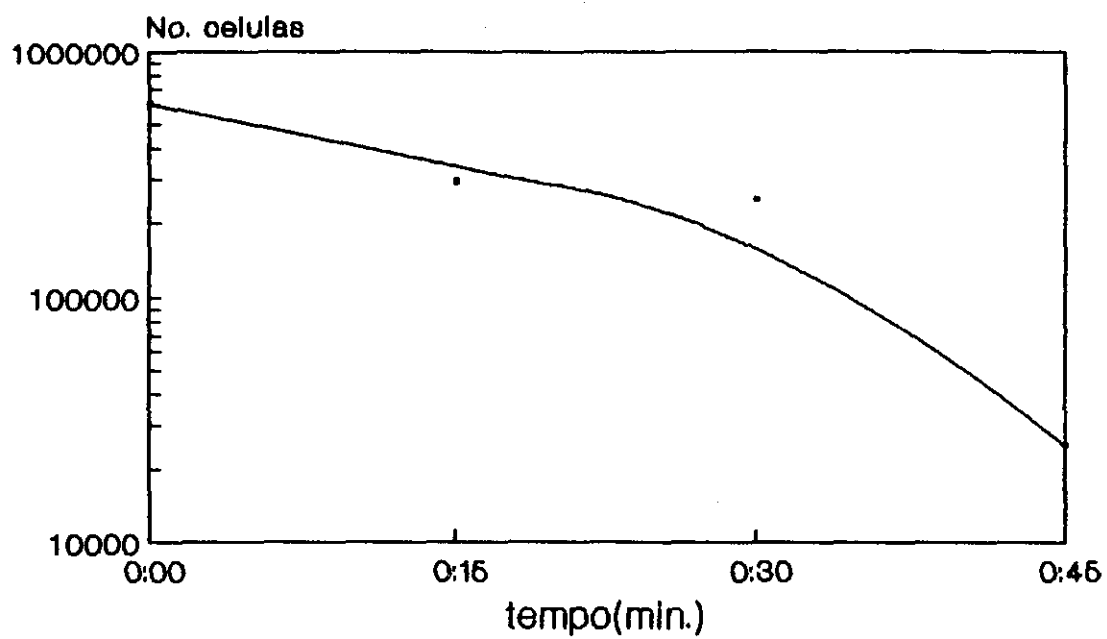


Figura 1. Curva de sobrevivência da linhagem de *Xcv* 479/*Nal^r* após tratamento com nitrosoguanidina.

Tabela 4. Número de colônias e porcentagem de sobrevivência de células tratadas com luz ultra violeta em diferentes tempos de exposição .

Tempo (segundos)	Número de colônias (por ml)	Porcentagem de sobrevivência
0"	5.0 * 10 ³	100.00
10"	0.6 * 10 ³	12.00
20"	0.145 * 10 ³	2.90
40"	0.01 * 10 ³	0.20
80"	0.0005 * 10 ³	0.01

A partir da porcentagem de sobrevivência foi construído o gráfico da Figura 2. Foi delimitada a faixa de 5% - 0.01% de sobrevivência para o isolamento de colônias a serem selecionadas quanto à patogenicidade e foram isoladas 890 colônias desse tratamento. Não foram observados mutantes com alteração de coloração de colônia.

2. ISOLAMENTO DE MUTANTES NAO PATOGENICOS

2.1. TESTE EM "SEEDLINGS"

O teste em "seedlings" foi o escolhido para a seleção inicial das células mutagenizadas, por já estar bem definido na literatura (Daniels *et al.*, 1984), sendo utilizado com sucesso para diversos sistemas modelo de interação planta-patógeno, inclusive

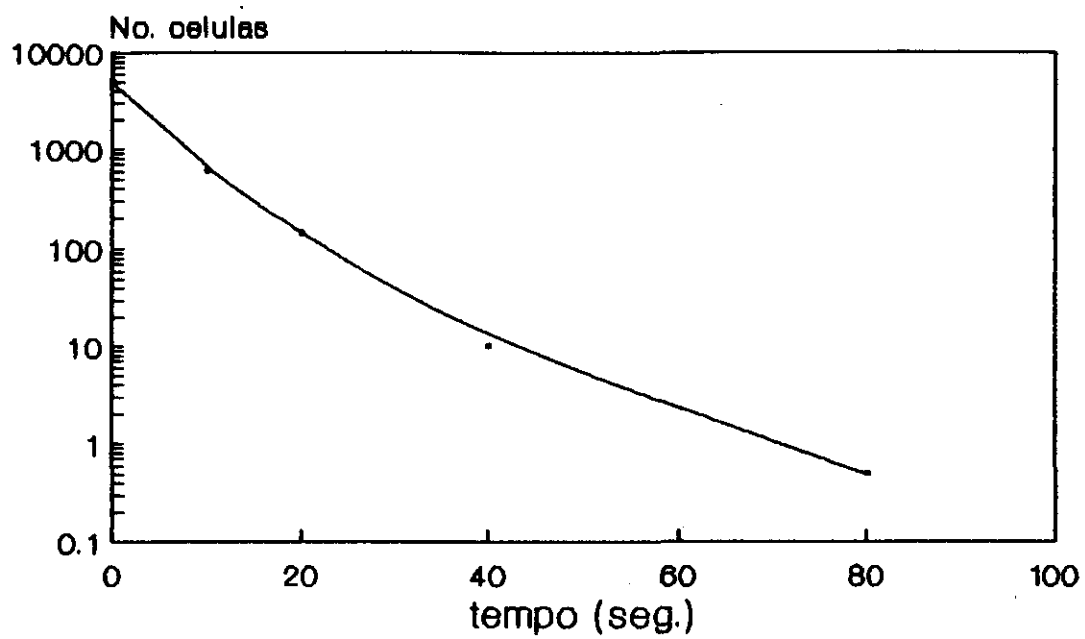


Figura 2. Curva de sobrevivência da linhagem Xcv 479/Nal^r após tratamento com luz ultravioleta.

tomate.

As plântulas de tomate inoculadas com *Xcv* começaram a apresentar sintomas após 3 a 5 dias após o início da infecção. Os sintomas manifestaram-se em geral começando por uma constrição na região ao redor do ponto de inóculo, que foi se espalhando ao longo do caule, levando à necrose total ou às vezes parcial do mesmo. O tecido necrosado apresentou-se completamente mole e translúcido, com uma coloração amarronzada. As folhas tornaram-se encharcadas, totalmente necrosadas, desfazendo-se ao toque (Fig.3). Plantas que apresentaram esse padrão de evolução de sintomas foram consideradas doentes. Outro grupo de plantas, considerado parcialmente doente, apresentou sintomas localizados na área de inóculo, com uma constrição que não evoluiu posteriormente para necrose, ou o fez em porção muito reduzida da plântula, podendo ocorrer ainda manifestação de sintomas apenas nas folhas. Finalmente, foram observadas plantas em que não houve qualquer manifestação de sintoma, classificadas como sadias (Fig. 3).

As colônias tratadas com UV e NTG foram testadas quanto à patogenicidade, sucessivamente, em várias etapas de seleção (Fig. 4).

Foram testadas inicialmente as 300 colônias provenientes do tratamento com NTG. A primeira seleção

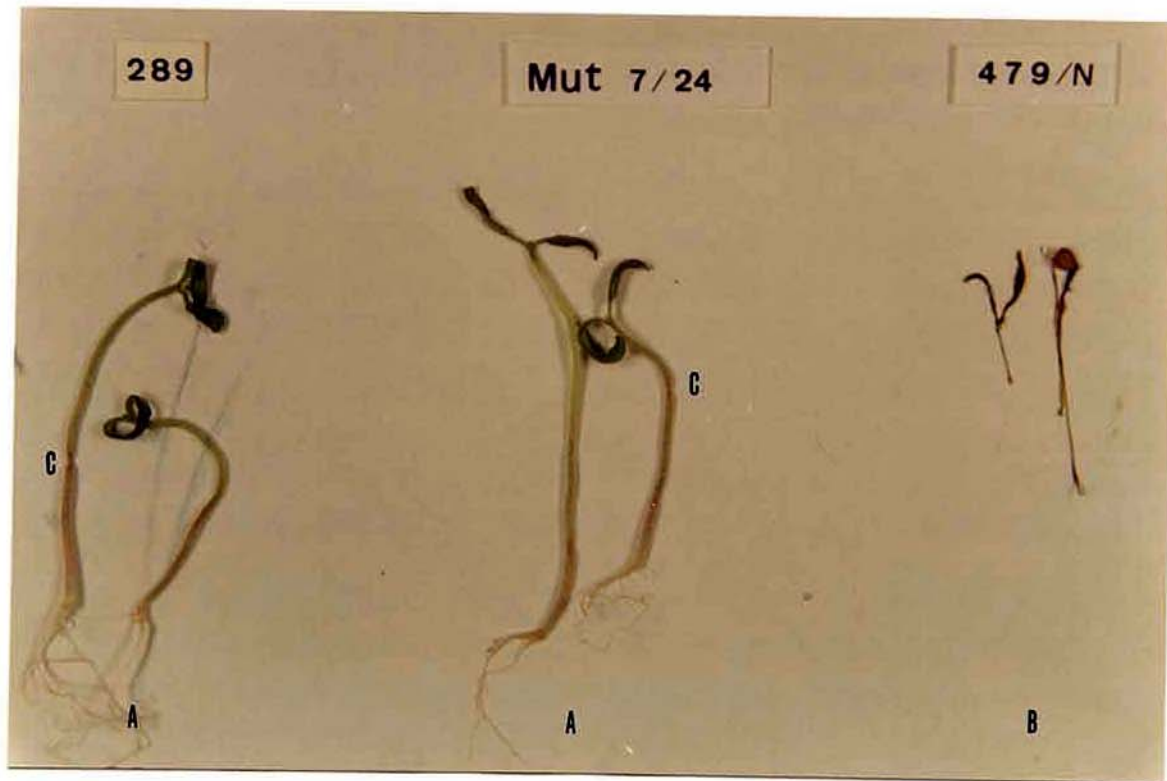


Figura 3. Teste em "seedlings" de tomate infectados com as linhagens *Xcv* 479/*Nal^r* (selvagem), mutante de NTG 7/24 e *Xcma* 289, utilizada como controle negativo. Pode ser destacado na foto: A) aparência das plantas saudias; B: necrose total da planta; C: detalhe do ponto de inóculo.

COLÔNIAS ISOLADAS
DOS TRATAMENTOS
COM :

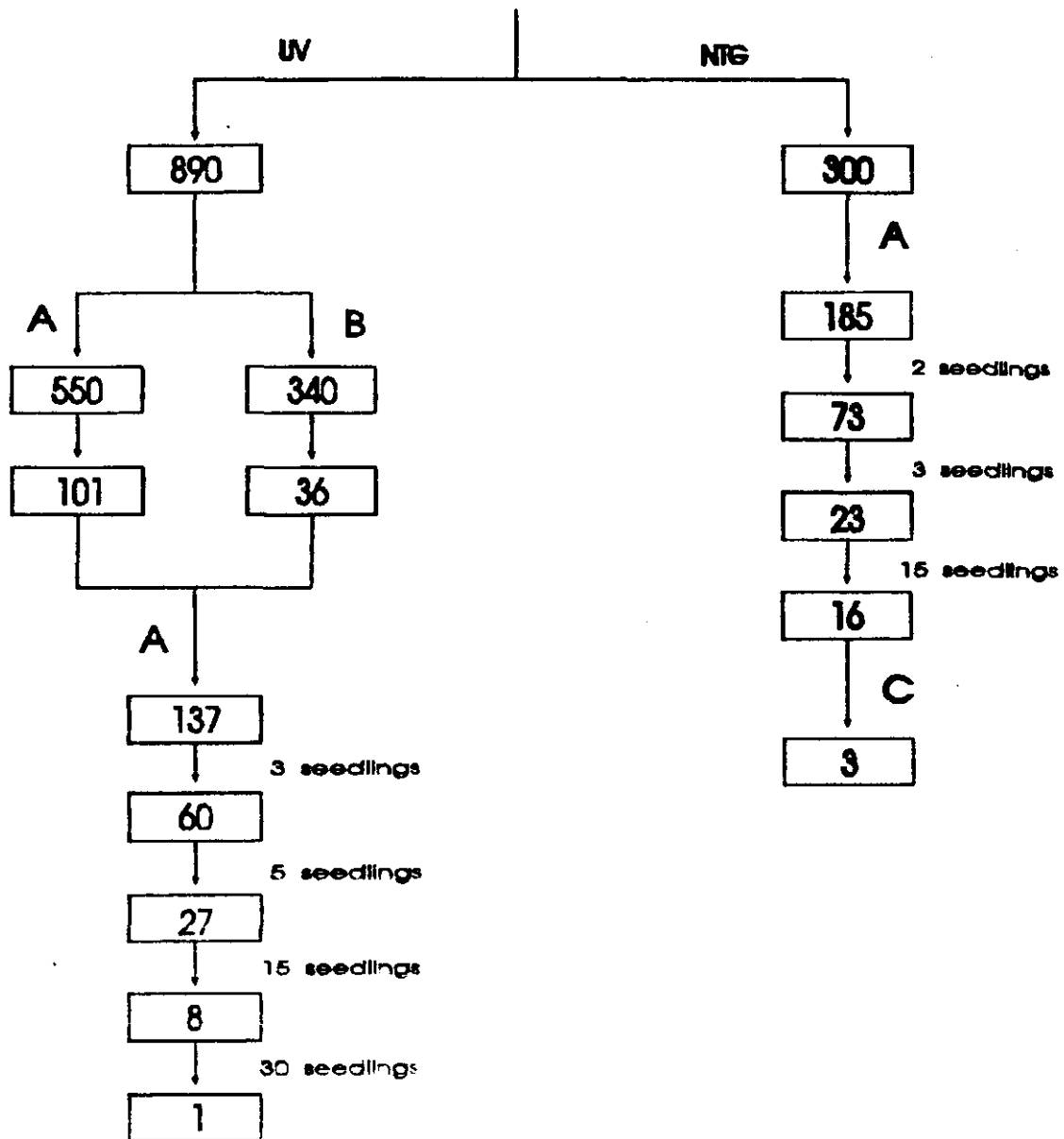


Figura 4. Esquema das etapas de seleção efetuadas para a identificação de mutantes não patogênicos, onde A: Teste em "seedlings", B: Teste em "seedlings" seccionados e C: Teste em plantas adultas.

foi realizada inoculando-se um "seedling" por colônia, reduzindo o número destas para 185. Houve na maioria desses casos um padrão de sintoma parcial e essas colônias foram submetidas a uma segunda seleção, inoculando-se dessa vez 2 "seedlings" por colônia. Foram selecionadas 73 colônias nesta segunda etapa que não apresentaram sintoma ou continuaram mostrando sintoma parcial. Após uma terceira etapa de seleção, onde foram inoculados três "seedlings"/colônia, estas foram reduzidas a 23 que, testadas em grupos de 15 "seedlings", levaram à identificação de 16 colônias que não desenvolveram sintomas ou que o fizeram em menos de 50% dos "seedlings" inoculados.

Quanto às colônias obtidas após tratamento com luz UV , foram testadas 550 das 890 na primeira seleção, de onde foram destacadas 101 colônias que não apresentaram sintoma ou não apresentaram um padrão claro quanto ao tipo de interação com a planta.

As 340 restantes foram selecionadas através de testes em "seedlings" seccionados (item 5.1.2 do Material e Métodos). A extremidade exposta foi inoculada com um palito esterilizado contendo cada colônia, individualmente. Através desse método, foram isoladas 36 colônias que não apresentaram sintoma para verificação posterior através do teste em "seedlings" convencional, desde que não levaram à manifestação de sintoma no tecido infectado. Nesse teste, os sintomas

caracterizaram-se por necrose do tecido da mesma forma já descrita para o teste de "seedling".

Considerando-se conjuntamente os resultados dos dois tipos de testes efetuados com as colônias derivadas do tratamento com luz UV, foram selecionadas 137 colônias dentre as 890 iniciais. Estas foram testadas novamente em grupos de três "seedlings", permitindo a identificação de 60 colônias que, retestadas em cinco "seedlings"/colônia, levaram à seleção de 27 possíveis mutantes. Ampliando-se para 15 o número de "seedlings" testados a partir desta etapa, foram isoladas 8 colônias que diferiram da bactéria selvagem quanto ao padrão de interação com a planta. Esses possíveis mutantes não patogênicos foram testados ainda uma vez em "seedlings", em grupos de 30 "seedlings" por colônia. Isso permitiu a classificação dessas linhagens em três grupos:

Grupo I - 3 colônias - mostraram-se patogênicas, sem diferença muito evidente em relação à linhagem selvagem. Induziram rápida evolução de sintomas e apodrecimento total da maioria das plântulas infectadas.

Grupo II - 4 colônias - padrão de comportamento não muito claro. Levou ao desenvolvimento de sintomas em apenas alguns indivíduos, ou induziu necrose parcial

dos indivíduos infectados, diferindo do controle positivo. Esse comportamento foi condizente com o apresentado por essas mesmas colônias em testes anteriores em "seedling".

Grupo III - 1 colônia - sem manifestação de sintomas nos testes efetuados, foi definido como um mutante de patogenicidade, devendo ser submetido a estudos mais detalhados quanto ao comportamento patogênico.

Deve ser destacado que esse mutante faz parte do grupo de 36 colônias selecionadas inicialmente através de teste em "seedlings" seccionados, demonstrando a aplicabilidade desse teste.

2.2. TESTES EM FOLHAS DE PLANTAS ADULTAS

Reduzido o número de linhagens a serem testadas, tornou-se possível a aplicação de outros tipos de teste de patogenicidade, inviáveis para a seleção de grande número de colônias.

Após os testes sucessivos em "seedling", foram realizados testes em folhas de plantas adultas (item 5.1.3 do Material e Métodos) com as 16 colônias de NTG, buscando uma melhor definição do fenótipo das colônias selecionadas.

Nos dois primeiros dias após a inoculação, não houve evolução perceptível de sintomas . A lesão, em todos os casos, permaneceu restrita ao ponto do inóculo. A partir do 3º dia de infecção, os sintomas começaram a aparecer em algumas plantas, enquanto em outras o espalhamento da lesão começou apenas a partir do 6º dia de infecção ou não ocorreu.

O primeiro indício de sintomas começou com clorose na região em torno do ponto de inóculo e às vezes murcha da folha. Os pontos iniciais de lesão, ou seja, as áreas de inóculo, mostraram-se bastante úmidos, com encharcamento do tecido foliar, e nas plantas que desenvolveram sintomas foram aumentando até confluírem e levarem à necrose total da mesma. Em outras plantas, essa necrose não foi total, os sintomas começaram a se manifestar tardiamente, somente a partir do 6º dia de infecção, e as lesões espalharam-se por uma área muito restrita em torno do ponto de inóculo.

Um terceiro grupo de plantas não desenvolveu sintomas . Não houve espalhamento da lesão , que permaneceu restrita ao ponto de inóculo, apresentando uma aparência mais seca, sem clorose da área ao redor, após 8 dias de observação.

Com base nessas observações, propôs-se uma classificação das colônias testadas em três grupos distintos, como feito anteriormente com as colônias de UV:

Grupo I - 13 colônias - reação positiva na planta, isto é, indução de sintoma a partir do 3º/4º dia de inoculação, levando ao apodrecimento total da folha, à semelhança do controle positivo, a linhagem 479/Nal^r.

Grupo II - 1 colônia - essa bactéria apresentou um tempo maior para induzir sintomas nas folhas. Nas plantas infectadas com essa linhagem, o espalhamento das lesões começou por volta do 5º/6º dia a partir do inóculo, contrastando com as linhagens do Grupo I e a selvagem, que levaram ao desenvolvimento de sintomas a partir do 3º/4º dia de infecção e ao 5º/6º dia a necrose das folhas foi total. Além disso, o apodrecimento do tecido infectado por essa linhagem foi apenas parcial após 8 dias de observação.

Grupo III - 2 colônias - neste grupo, não houve espalhamento da lesão além do ponto de inóculo, que manteve uma aparência seca, preferencialmente ao "encharcamento" característico de colônias do Grupo I.

As colônias do Grupo III foram selecionadas potencialmente como mutantes de patogenicidade e a do grupo II, comparados os resultados dos dois tipos de teste efetuados, foi selecionada também para verificação em testes posteriores.

Os resultados obtidos até esta etapa na seleção de mutantes não patogênicos encontram-se sumarizados na Figura 4.

Permanecem por ser melhor caracterizados em testes em planta adulta e repetições em maior número de "seedlings", 4 colônias de UV, citadas no Grupo II da classificação proposta acima. Entretanto, dado que o objetivo do presente trabalho não foi simplesmente a definição e caracterização de mutantes e já haviam sido estabelecidas quatro linhagens mutantes, priorizou-se a caracterização dos mesmos e a complementação de um deles com o banco genômico de Xcv 317 a uma caracterização mais precisa dessas colônias.

2.3. SELEÇÃO FINAL DE MUTANTES NÃO PATOGÊNICOS

Analisando conjuntamente os dados obtidos para as células tratadas com os dois mutagênicos, podemos definir basicamente 4 mutantes, 3 de NTG e 1 de UV, designados NTG 7/21, NTG 7/24, NTG 8/31 e UV 16/14 (o primeiro número correspondendo à numeração da placa da qual o mutante foi isolado, e o segundo número à sua localização na mesma). A linhagem 8/31 foi classificada dentro do grupo II e as linhagens 7/21 e 7/24, no Grupo III das colônias tratadas com NTG.

Essas linhagens foram testadas ainda uma vez em "seedlings", para uma verificação definitiva de seu comportamento quanto à patogenicidade. Os resultados finais dos experimentos em "seedling" envolvendo essas linhagens estão apresentados na Tabela 5 e Figura 5.

Tabela 5 - Teste de patogenicidade em "seedlings" de tomate com linhagens mutantes de Xcv induzidas com NTG e UV.

Linhagem	Doentes	Parciais	Sadios	Total
NTG 7/21	22	11	74	107
NTG 7/24	3	4	88	95
NTG 8/31	14	0	42	56
UV 16/14	6	3	93	102

2.4. TESTE EM SEMENTES

Foram realizados testes com as linhagens de mutantes de NTG: 7/21, 7/24, 8/31 e UV: 16/14, utilizando-se culturas dessas linhagens no tratamento de sementes, para confirmação dos testes realizados em "seedlings".

Nos testes realizados, a germinação das sementes infectadas ocorreu 4 - 5 dias após a semeadura. A manifestação dos sintomas começou por volta de 7 - 8 dias a partir do tratamento das sementes, com o aparecimento de manchas na forma de pontos amarronzados

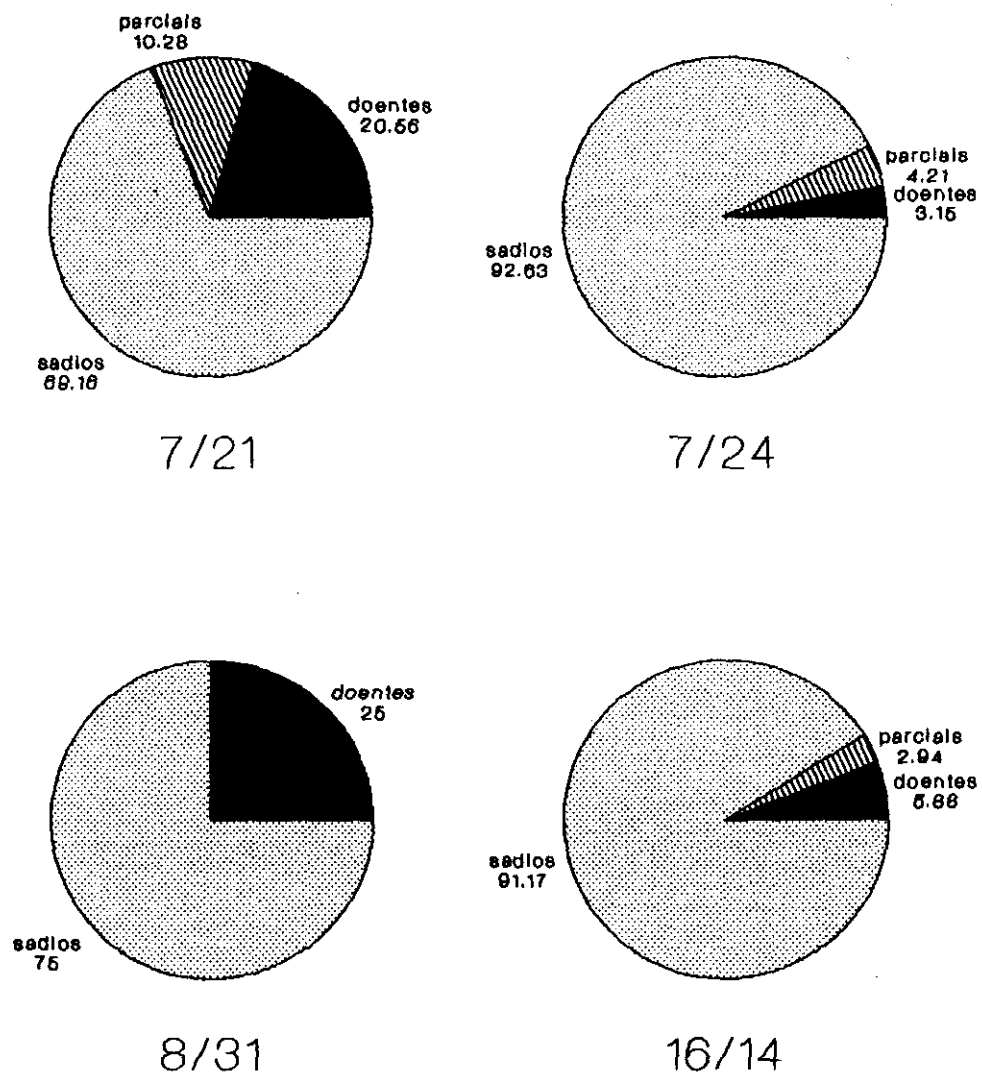


Figura 5. Teste em "seedlings" com os mutantes não patogênicos de *Xcv* 479/Nalr.

nas folhas cotiledonares e ao longo do caule da plântula, ou com o início de necrose nas folhas, que começaram a apresentar uma aparência de encharcamento do tecido. Em algumas plantas, os sintomas evoluíram para necrose total ou parcial da plântula, atingindo as folhas e pelo menos a metade do caule. Plantas que apresentaram esse padrão foram definidas como doentes.

Em outras plantas, os sintomas não evoluíram, permanecendo na forma das manchas acima referidas, ou apresentando necrose apenas nas folhas, sem apresentar qualquer lesão no caule. Essas plantas foram consideradas parcialmente doentes.

Finalmente, foi observado um grupo de plantas que não apresentou qualquer sinal de infecção no caule ou na folha, permanecendo como os indivíduos tratados com a linhagem *Xcma* 289, utilizada como controle negativo. Os resultados desses experimentos estão apresentados na Tabela 6 e Figura 6.

Tabela 6 - Testes em sementes com linhagens mutantes de *Xcv* 479/Nal^r.

Linhagem	Doentes	Parciais	Sadios	Total
NTG 7/21	23	63	102	188
NTG 7/24	8	90	149	247
NTG 8/31	114	70	85	269
UV 16/14	31	68	102	201

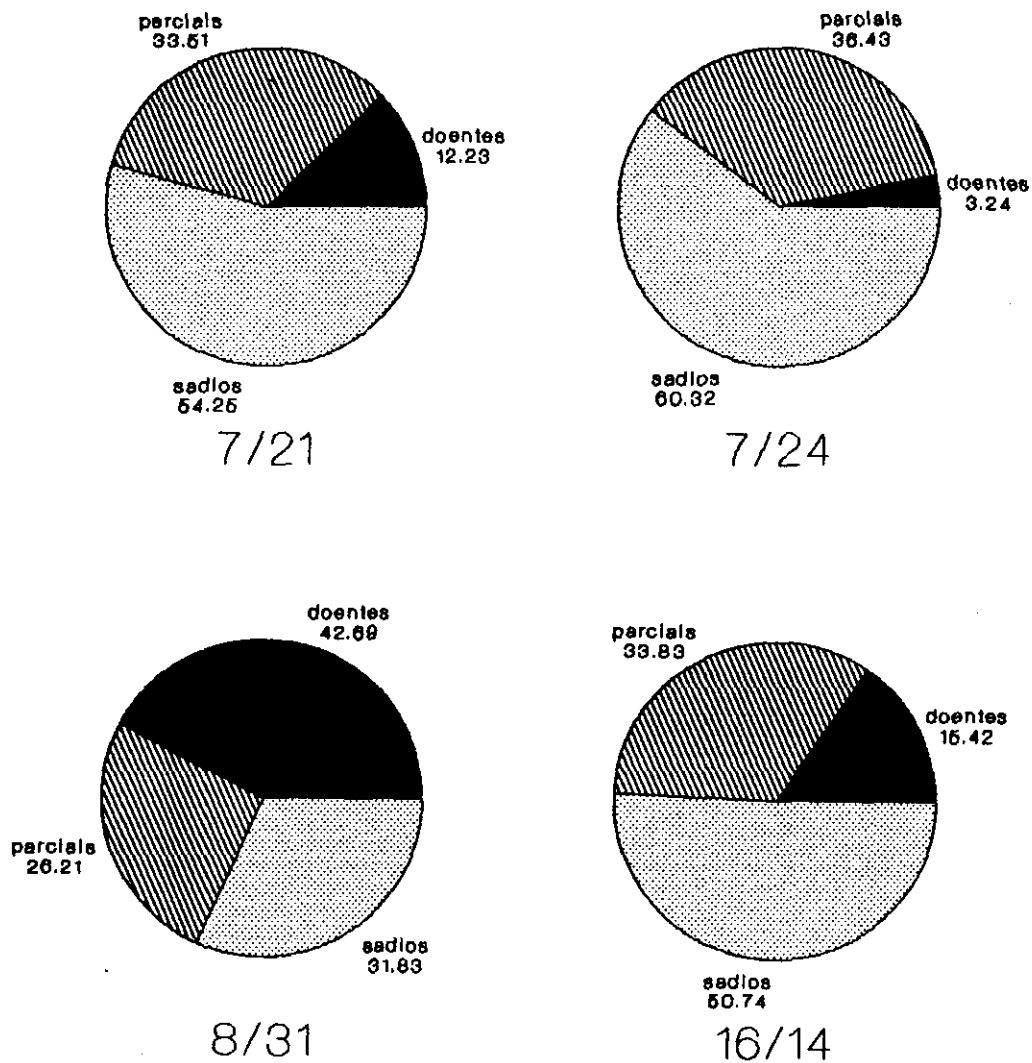


Figura 6. Teste em sementes com os mutantes não patogênicos de *Xcv* 479/Nalr.

3. CARACTERIZAÇÃO DOS MUTANTES

Os mutantes isolados foram analisados quanto às características abaixo relacionadas, utilizando-se sempre a colônia selvagem Xcv 479 como controle.

3.1. CRESCIMENTO EM MEIO MÍNIMO

A capacidade de crescimento em meio mínimo foi verificada em meio MP1 e M9, que contêm apenas sais minerais e glucose como fonte de carbono.

As linhagens mutantes cresceram normalmente em ambos os meios mínimos testados, demonstrando que são prototróficas.

3.2 PRODUÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES

Foi verificada, através de crescimento dos mutantes em meios seletivos apropriados, a capacidade de produção das seguintes enzimas extracelulares: amilase, celulase, lipase, pectinase e protease.

Todas as colônias testadas, isto é, a selvagem 479/Nal, Xcv 317 e os mutantes 7/21, 7/24, 8/31 e 16/14, mostraram-se positivas quanto à produção de todas as enzimas citadas, o que foi verificado através da formação de halo em torno das colônias produtoras em placas de meio sólido.

3.3. CURVA DE CRESCIMENTO

As curvas de crescimento *in vitro* das colônias mutantes e da selvagem foram determinadas através de leitura da absorbância das culturas a intervalos de tempo de três horas. Os dados obtidos durante 33h de crescimento em meio líquido estão apresentados na curva de crescimento da Figura 7.

3.4. HIPERSENSIBILIDADE

Foi realizado um teste para a verificação de indução ou não, pelos mutantes, de reação de hipersensibilidade em plantas não hospedeiras. Esse teste foi feito utilizando-se folhas destacadas de plantas de tabaco, como descrito no item 6.4 do Material e Métodos.

Foram testadas as linhagens mutantes de NTG 7/21 e 7/24 e a de UV 16/14, além da selvagem 479/Nal^r. Como controle positivo, foi utilizada Xcma 289, desde que havia sido determinado previamente que essa linhagem induz reação de hipersensibilidade em tabaco .

Todas as linhagens testadas mostraram-se positivas quanto à indução de resposta de hipersensibilidade em tabaco.

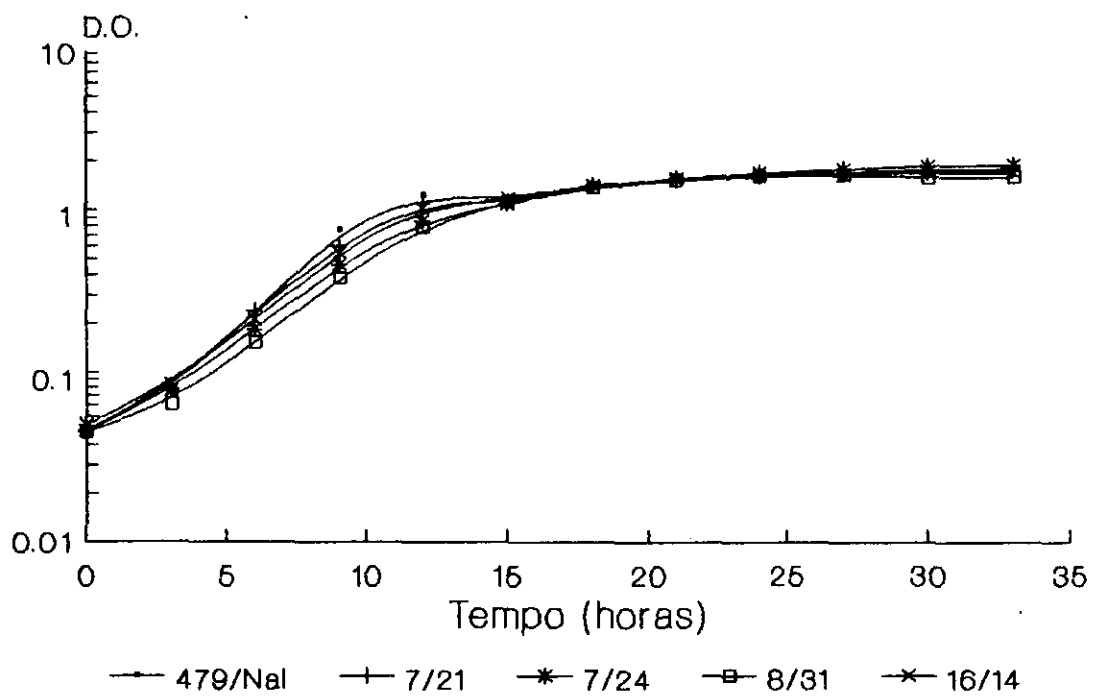


Figura 7. Curva de crescimento comparativa das linhagens *Xcv* 479/Nal^r e os mutantes não patogênicos 7/21, 7/24, 8/31 e 16/14.

4. CONSTRUÇÃO DO BANCO GENÔMICO DE *Xcv* 317 NO VETOR pUFR027

Para a construção do banco genômico foi feita digestão por 14 - 16h de 5.0µg de DNA total de *Xcv* 317 com EcoRI. O material digerido foi purificado com GeneClean, sendo isolados fragmentos variando de 2.0 a 20.0Kb, numa concentração de 70ng/µl. O DNA do vetor foi digerido com EcoRI por 4h, defosforilado com BAP e purificado com GeneClean, sendo recuperado numa concentração de 100ng/µl.

Foram utilizados 600ng totais de DNA no sistema de ligação numa relação molar de aproximadamente 1:1, considerando-se o tamanho médio de inserto como 11.0 Kb e tendo o vetor 9.3 Kb.

Foram utilizados 10.0µl (300ng) desse sistema para transformação de *E. coli* DH5α, e o sistema foi plaqueado em meio contendo X-gal e IPTG.

Foram obtidas 890 colônias recombinantes dessa transformação. Mais 5.0µl do sistema de ligação (150ng de DNA) foram introduzidos em *E. coli* DH5α por transformação e o plaqueamento dos transformantes em X-gal resultou em 297 colônias brancas. Dessa forma, a partir de 450ng de DNA, foram obtidas 1187 colônias recombinantes.

Foi feita uma amostragem de 35 clones aleatoriamente. O DNA desses clones foi extraído e

digerido com EcoRI, para verificação do tamanho médio do inserto em pares de bases, permitindo a aplicação do cálculo de representatividade do banco genômico proposto por Carbon & Clarke, 1976. O tamanho médio de inserto obtido foi 6.0 Kb, estimados através de um programa de computador, **ELETRO**, desenvolvido pelo Prof. Adilson Leite (Leite, A., comunicação pessoal). A Figura 8 mostra 15 desses clones, permitindo uma visualização da variação de tamanho dos insertos.

O genoma de *Xcv* foi estimado em 3000.0 Kb totais, tomando como referência a estimativa de Gabriel *et al.* (1986) para *X. c. pv malvacearum*.

Aplicando-se a fórmula para cálculo da representatividade de banco genômico aos resultados apresentados e assumindo-se uma probabilidade de 90% de todo o genoma de *Xcv* 317 estar representado, temos que:

$$N = \ln(1 - 0,90) / \ln(1 - 6000/3000000)$$

$$N = 1150 \text{ colônias/micrograma de DNA/ml}$$

Os dados obtidos, 1187 colônias/450ng de DNA indicam portanto que, teoricamente, pode-se considerar para esse banco uma probabilidade de 90-91% de estar representando todo o genoma de *Xcv* 317.

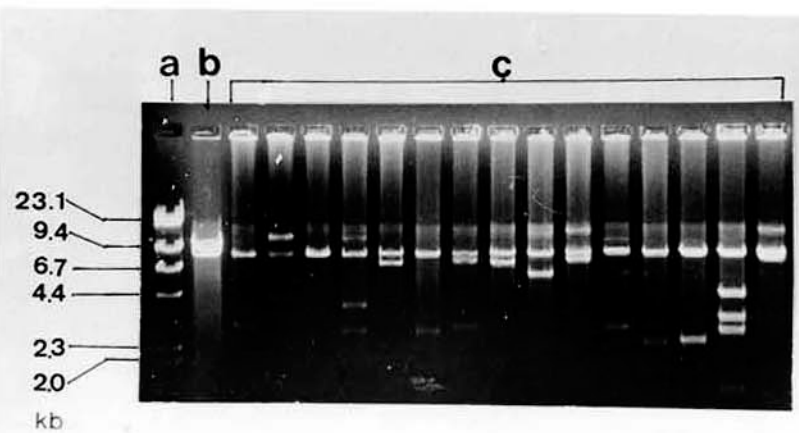


Figura 8. Clones do banco genômico de *Xcv* 317 - tamanho médio dos fragmentos clonados, onde a) lambda Hind III, b) pUFR027 linearizado com *EcoRI* e c) 15 clones do banco genômico de *Xcv*, amostrados ao acaso, digeridos com *EcoRI*.

5. COMPLEMENTAÇÃO DO MUTANTE NAO PATOGÊNICO 7/24 DE *Xcv* 479/NAL COM O BANCO GENÔMICO DE *Xcv* 317

O mutante NTG 7/24 foi selecionado para complementação com o banco de *Xcv* 317, por ser o mutante que apresentou a resposta mais clara nos testes de patogenicidade realizados (ver Tabelas 5 e 6 e Figuras 5 e 6), especialmente no teste em "seedling", estabelecido como o teste básico para a seleção inicial quanto à patogenicidade.

Foi feita conjugação *en masse* do banco com a linhagem mutante 7/24, através de cruzamentos triparentais. Foram isoladas 1924 colônias transconjugantes, das quais 382 foram utilizadas inicialmente em testes em "seedlings", visando a identificação de clones apresentando complementação positiva, com recuperação do fenótipo de patogenicidade (ver esquema apresentado na Figura 9).

Após a primeira seleção, foram identificadas 72 colônias que induziram sintomas pelo menos parciais em "seedling". Destas, foram selecionadas as 50 que deram respostas aparentemente mais virulentas, para testes em grupos de 5 "seedlings". Desse teste, foram isoladas 25 clones, que foram submetidos a uma outra etapa de seleção em grupos de 15 "seedlings". Isso permitiu a identificação de um clone que apresentou virulência semelhante à linhagem *Xcv* 317, utilizada como controle

COLÔNIAS OBTIDAS DO CRUZAMENTO
DO BANCO DE Xcv 317 COM O MUTANTE 7/24

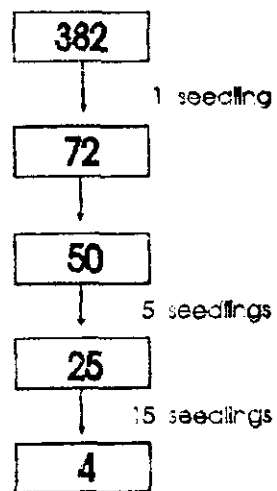


Figura 9. Esquema das etapas de seleção realizadas para a identificação de clones com complementação positiva para o mutante 7/24, após cruzamento deste com o banco genômico da linhagem de Xcv 317.

positivo, com uma porcentagem de "seedlings" infectados superior a 80%. Além desse clone, foram identificados outros 3 que mostraram uma resposta bastante diferente da induzida pelo mutante 7/24, utilizado como controle negativo nesses experimentos, mostrando-se com uma resposta mais próxima àquela induzida pela linhagem Xcv 317.

Foram feitos novos testes com esses clones, envolvendo maior número de "seedlings", o que confirmou os resultados citados anteriormente, isto é, continuaram mostrando-se com uma virulência semelhante ao controle positivo, Xcv 317. Esses clones foram designados, respectivamente, pVE7241, pVE7242, pVE7243 e pVE7244. Os resultados dos testes em "seedlings" observados para esses clones estão apresentados na Tabela 7 e Figura 10.

Tabela 7 - Testes em "seedlings" dos clones isolados após complementação do mutante 7/24 com o banco genômico de Xcv 317.

Linhagem	Doentes	Sadios	Total
pVE7241	65	13	78
pVE7242	49	7	56
pVE7243	29	6	35
pVE7244	32	7	39

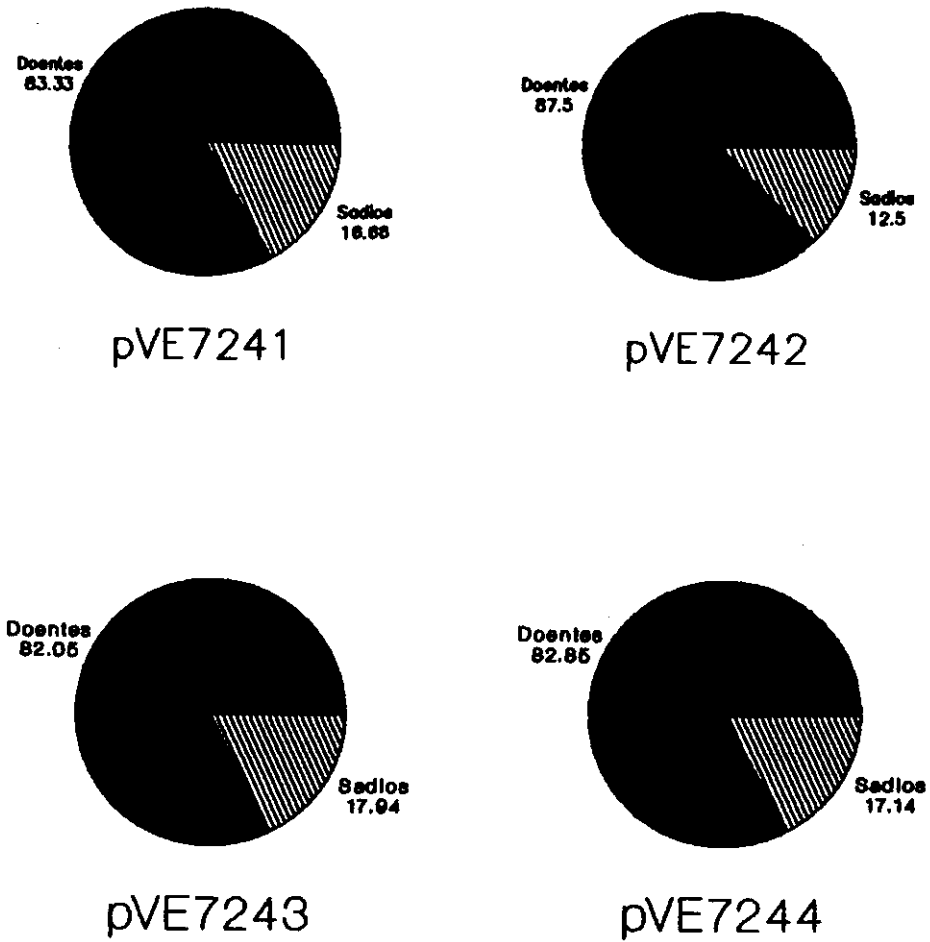


Figura 10. Teste em "seedlings" dos clones obtidos após complementação do mutante 7/24 com o banco genômico de Xcv 317.

Os clones pVE7241 e pVE7242 foram submetidos a testes em sementes, posteriormente. Os resultados estão apresentados na Tabela 8 e Figura 11.

Tabela 8 - Testes em sementes realizados com os clones pVE7241 e pVE7242.

Linhagem	Doentes	Parciais	Sadios	Total
pVE7241	66	4	1	71
pVE7242	15	13	6	34

Esses clones foram analisados quanto ao tamanho do fragmento, em pares de base, que mostrou-se capaz de complementar o mutante 7/24.

Os clones pVE7241 e pVE7242 apresentaram fragmentos com tamanho estimado em cerca de 4.0 Kb. Os clones pVE7243 e pVE7244 apresentaram, respectivamente, fragmentos de 5.0 Kb e 3.0 Kb, aproximadamente.

Os fragmentos liberados pelos clones pVE7241, pVE7242 e pVE7243, após digestão com *EcoRI*, estão apresentados na Figura 12.

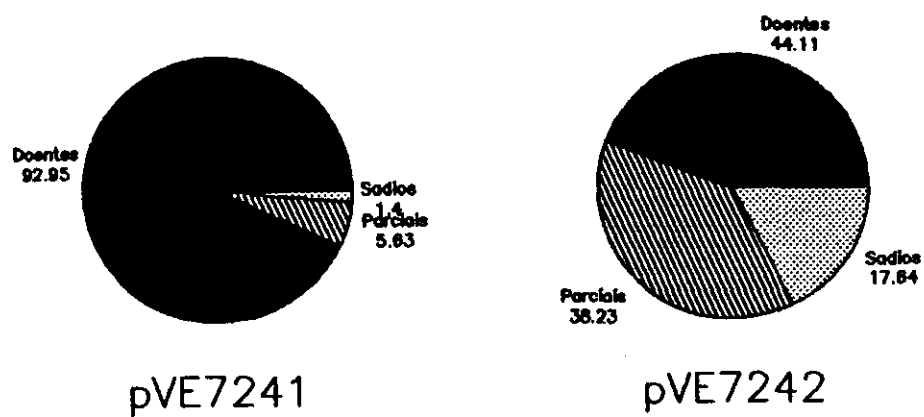


Figura 11. Teste em sementes com os clones pVE7241 e pVE7242.

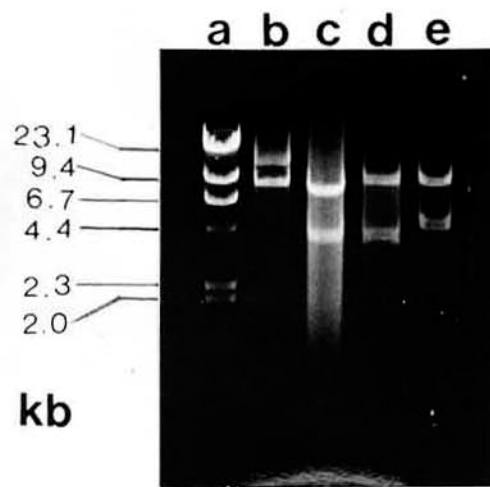


Figura 12. Clones que apresentaram complementação positiva quanto à patogenicidade , após cruzamento do banco genômico de *Xcv* 317 com o mutante 7/24. a) lambda Hind III; b) pUFR027 linearizado com *EcoRI* ; c) pVE7241; d) pVE7242 ; e) pVE7243.

6.COMPLEMENTAÇÃO DE UMA LINHAGEM DE *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* COM O BANCO GENÔMICO DE *X. c. pv. vesicatoria*.

A linhagem de *Xcma* 289 escolhida para esses experimentos devido ao fato de que, utilizada como controle negativo em todos os testes de patogenicidade realizados , não induziu sintomas em "seedlings", nem hipocótilos, nem folhas de plantas adultas de tomate.

Foi isolado um mutante da linhagem *Xcma* 289 resistente ao antibiótico ácido nalidíxico e o banco genômico de *Xcv* foi transferido para *Xcma* 289/Nal^r por conjugação.

Foram isolados 640 transconjugantes a partir desse cruzamento, testados quanto à patogenicidade inicialmente em testes de hipocótilo.

Nesse teste de patogenicidade , os sintomas observados caracterizaram-se por necrose do fragmento de hipocótilo, que começou a mostrar-se translúcido a partir do terceiro/quarto dia de infecção. A partir do quinto/sexto dia, os fragmentos tornaram-se totalmente necrosados, com o tecido completamente mole, desfazendo-se ao toque, ou continuaram a mostrar-se translúcidos, mas com o tecido amolecido ou apresentando necrose de, pelo menos, metade do fragmento. Dessa forma, foram selecionados para testes posteriores os clones que induziram respostas que se

enquadraram dentro desse padrão, considerado positivo quanto à patogenicidade. Plantas que não manifestaram qualquer tipo de sintoma, permanecendo , após 5/6 dias de infecção, sem alteração na aparência do tecido, foram consideradas sadias.

Um esquema com as várias etapas de seleção de clones positivos quanto à virulência em tomate está apresentado na Figura 13.

Após a primeira seleção, foram isoladas 146 clones que mostraram-se positivos dentro dos padrões citados acima. Essas colônias foram testadas novamente em lotes de três "seedlings", chegando-se então a 47 colônias positivas , que foram selecionadas em placas contendo 15 fragmentos de hipocótilo/placa, na terceira etapa de seleção. Isso levou ao isolamento de 31 colônias, que retestadas em grupos de 30 hipocótilos permitiram a identificação de 13 colônias positivas.

Essas 13 colônias foram testadas ainda uma vez, em lotes de três placas contendo 15 hipocótilos/placa para cada colônia. Dessa última análise em hipocótilos foram recuperados 5 clones, designados pVEMA51, pVEMA62, pVEMA71, pVEMA73 e pVEMA74 , que apresentaram resposta bastante diferente da linhagem 289/Nal, utilizada como controle negativo.

COLÔNIAS OBTIDAS DO CRUZAMENTO
DO BANCO DE *Xcv* COM *Xcma* 289/*Nal*

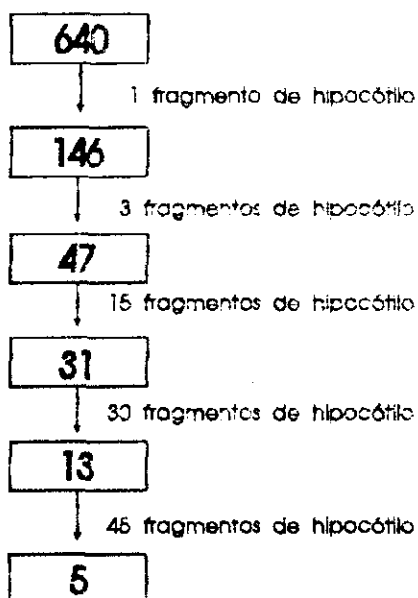


Figura 13. Esquema das etapas de seleção de clones de *Xcma* 289/*Nal*^r positivos quanto à patogenicidade em tomate, após cruzamento dessa linhagem com o banco genômico de *Xcv* 317.

Esses dados encontram-se sumarizados na Tabela 9 e Figura 14.

Tabela 9 - Testes em hipocótilos de tomate com clones isolados da conjugação de *Xcma* 289/Nal com o banco genômico de *Xcv* 317.

Linhagem	Doentes	Sadios	Total
289/Nal	36	118	154
pVEMA51	68	44	112
pVEMA62	75	38	113
pVEMA71	44	17	61
pVEMA73	48	12	60
pVEMA74	44	16	60

Esses clones foram testados em "seedlings" também, para verificação de seu comportamento em outro tipo de teste de patogenicidade.

Os sintomas causados em "seedlings" por esses clones foram atípicos. Foram definidas como doentes, neste caso, plantas que apresentaram lesão nas folhas, que tornaram-se amareladas ou amarronzadas; como parciais, plantas que mostraram início dessas lesões; e como sadias, plantas que não mostraram quaisquer alterações.

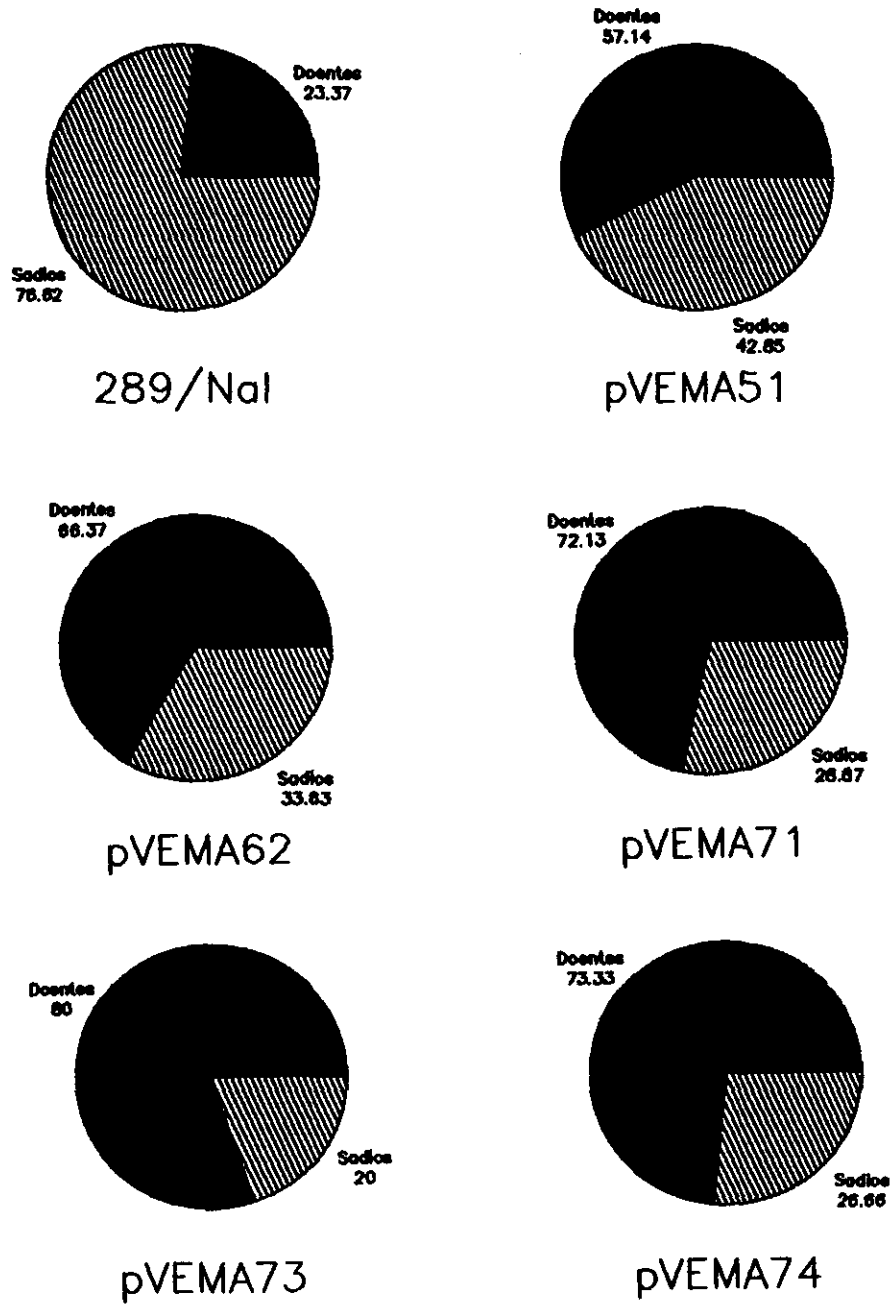


Figura 14. Teste em hipocótilos de tomate com clones isolados da conjugação de *Xcma* 289/NaI^r com o banco genômico de *Xcv* 317.

Os resultados desses experimentos encontram-se sumarizados na Tabela 10 e Figura 15.

Tabela 10 - Testes em "seedling" realizados com clones selecionados da conjugação de Xcms 289/Nal com o banco genômico de Xcv 317 .

Linhagem	Doentes	Parciais	Sadios	Total
289/Nal	0	0	19	19
pVEMA51	3	1	10	14
pVEMA62	1	1	14	16
pVEMA71	3	6	6	15
pVEMA73	7	8	16	31
pVEMA74	3	2	12	17

Foram realizados, ainda, testes em sementes com dois dos clones que apresentaram maior virulência nos experimentos descritos acima, pVEMA73 e pVEMA74. Os resultados desses testes estão apresentados na Tabela 11 e Figura 16.

Tabela 11 - Testes em sementes com os clones pVEMA73 e pVEMA74.

Linhagem	Doentes	Parciais	Sadios	Total
289/Nal	1	3	20	24
pVEMA73	12	17	11	40
pVEMA74	10	5	31	46

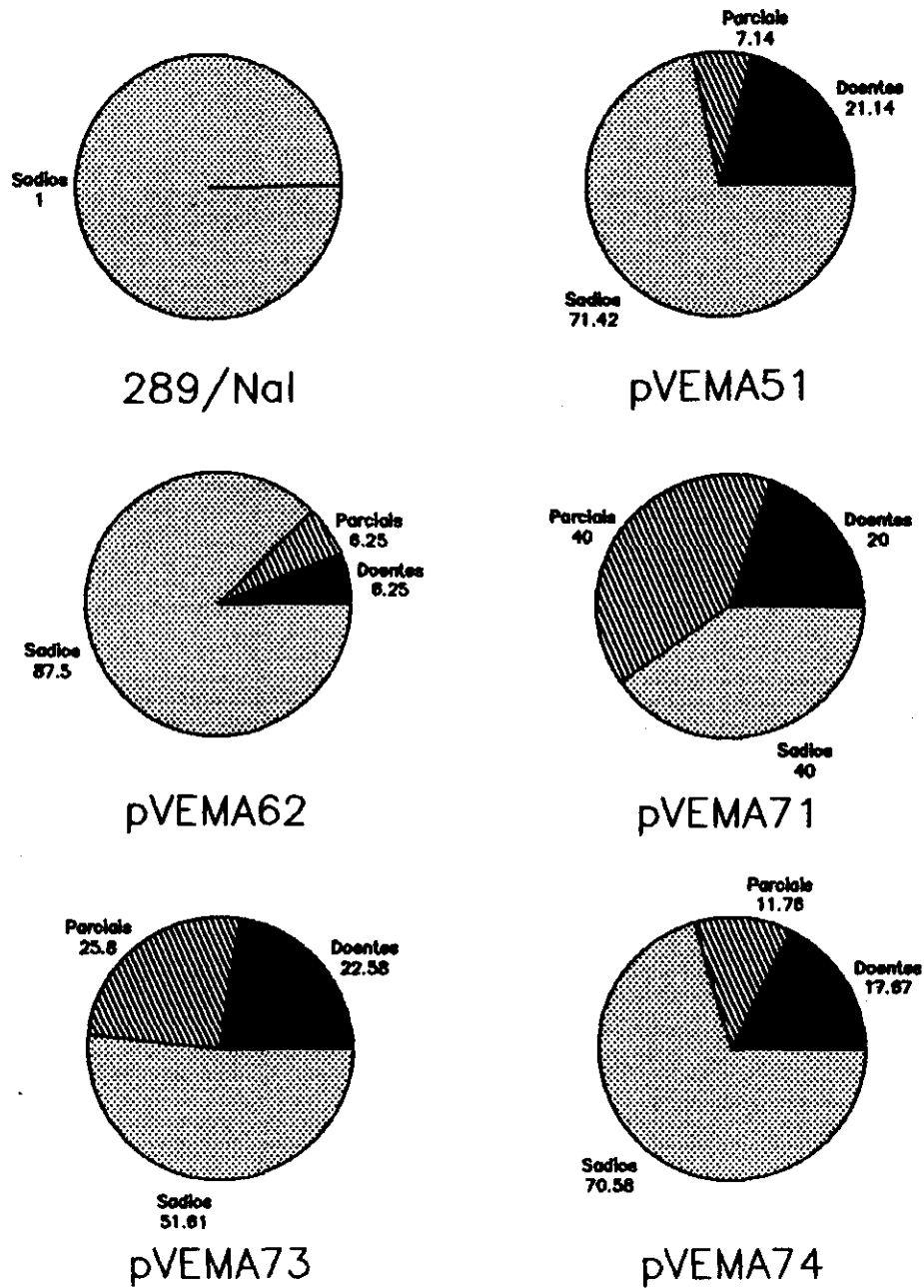


Figura 15. Teste em "seedlings" com os clones selecionados após conjugação de *Xcma* 289/Nal^r com o banco genômico de *Xcv* 317.

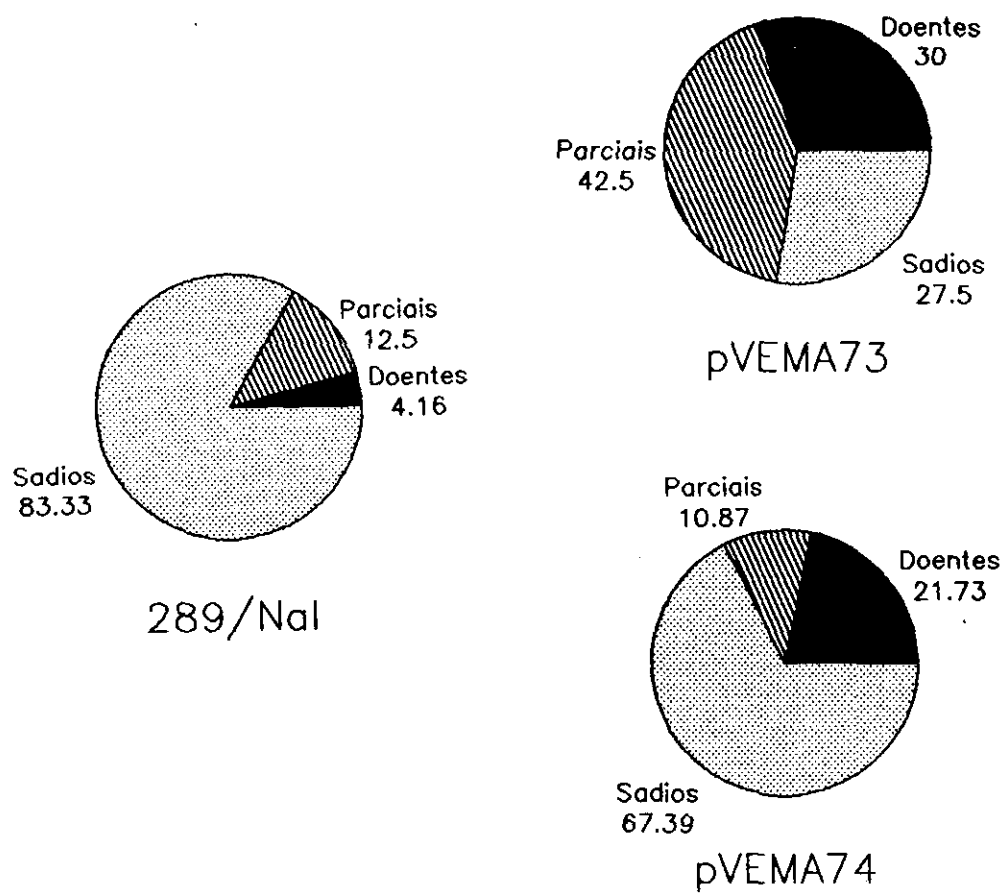


Figura 16. Testes em sementes com os clones pVEMA73 e pVEMA74.

Os clones que apresentaram-se mais virulentos em tomate, considerando-se os resultados de testes em hipocótilos e "seedlings" descritos acima, pVEMA71, pVEMA73 e pVEMA74, foram analisados quanto ao tamanho, em pares de base, dos fragmentos que conferiram alteração na interação de *Xcma* com plantas de tomate.

Os clones apresentaram fragmentos de, aproximadamente, 2.3 Kb - pVEMA71 e pVEMA73 - e 6.0 Kb - pVEMA74. Esses dados podem ser visualizados na Figura 17.

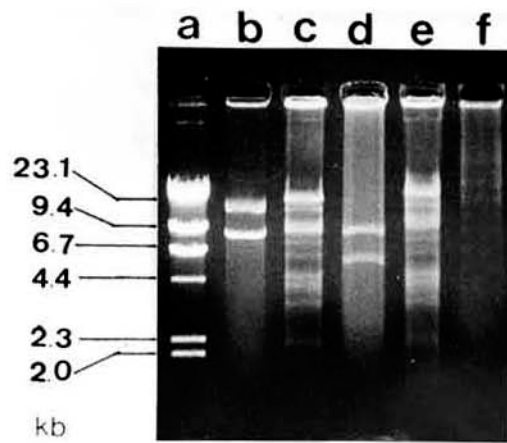


Figura 17. Clones de *Xcma* 289/Nal^r que mostraram-se virulentos em tomate após cruzamento com o banco genômico de *Xcv* 317. a) lambda Hind III; b) pUFR027 linearizado com *Eco*RI; c) pVEMA73; d) pVEMA74; e) pVEMA71; f) plasmídios nativos de *Xcma* 289/Nal^r.

DISCUSSÃO

1. INDUÇÃO DE MUTAÇÃO

Os dados obtidos nos experimentos de mutagênese mostram que, nas condições em que estes foram realizados, o NTG demonstrou ser um mutagênico muito mais poderoso que a luz UV, com frequência de mutantes não patogênicos de 1%, enquanto entre células tratadas com UV essa porcentagem foi de 0.1%. Isso parece ser corroborado pela porcentagem de mutantes brancos obtidos com NTG, de 1%, sendo que entre as colônias recuperadas do tratamento com UV mutantes brancos não foram observados.

A frequência de mutação obtida por tratamento com NTG está dentro da faixa descrita na literatura. Daniels *et al.* (1984a) obtiveram uma taxa de 0.3% de mutantes não patogênicos entre as células tratadas, em *X. c. pv. campestris*. Bonas *et al.* (1991) obtiveram 2.43% e 0.6% de mutantes não patogênicos de *X. c. pv. vesicatoria*, correspondentes a tratamentos de duas linhagens diferentes. Hwang *et al.* (1992) obtiveram praticamente a mesma frequência de mutagênese para mutantes não patogênicos e mutantes brancos que a descrita neste trabalho, cerca de 1%.

Quanto à frequência de mutação induzida por luz UV, Patil *et al.* (1974) isolaram um mutante não

patogênico de *Pseudomonas phaseolicola* entre 108 colônias testadas, mostrando uma frequência de aproximadamente 1%, o que contrasta bastante com a frequência de 0,1% observadas nos experimentos aqui descritos, no único trabalho encontrado na literatura envolvendo genes de patogenicidade mutados com UV .

A baixa frequência de mutantes não patogênicos induzidos por luz UV pode ser decorrente da natureza das mutações causadas por esse agente mutagênico, preferencialmente mutações de ponto. Isso pode levar a mutações silenciosas, ou seja, alterações no DNA que não se expressam a nível fenotípico, ou à manutenção de certa função residual pelo gene, de forma a dificultar a detecção de mutantes.

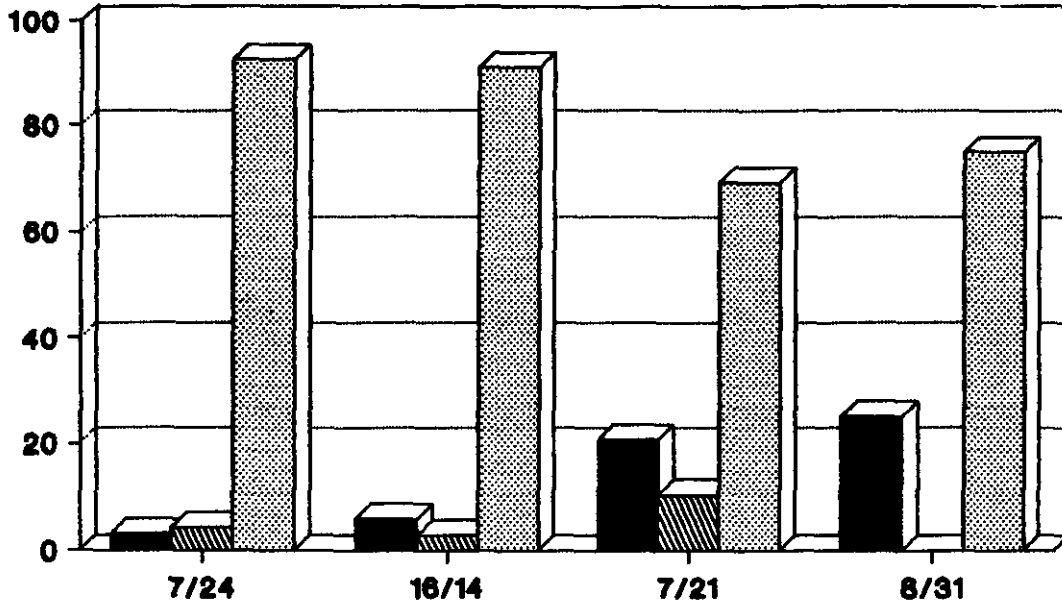
O fato de terem sido identificadas 4 colônias tratadas com UV que mostraram alteração quanto à virulência, porém continuaram infectando uma porcentagem das plantas inoculadas através de testes realizados em diferentes ocasiões, parece concordar com a suposição de que o gene alterado continue se expressando, ainda que de forma reduzida. Esse tipo de ocorrência na mutagênese com UV tem sido relatada (Klement *et al.*, 1990).

2. ISOLAMENTO DE MUTANTES NAO PATOGÊNICOS

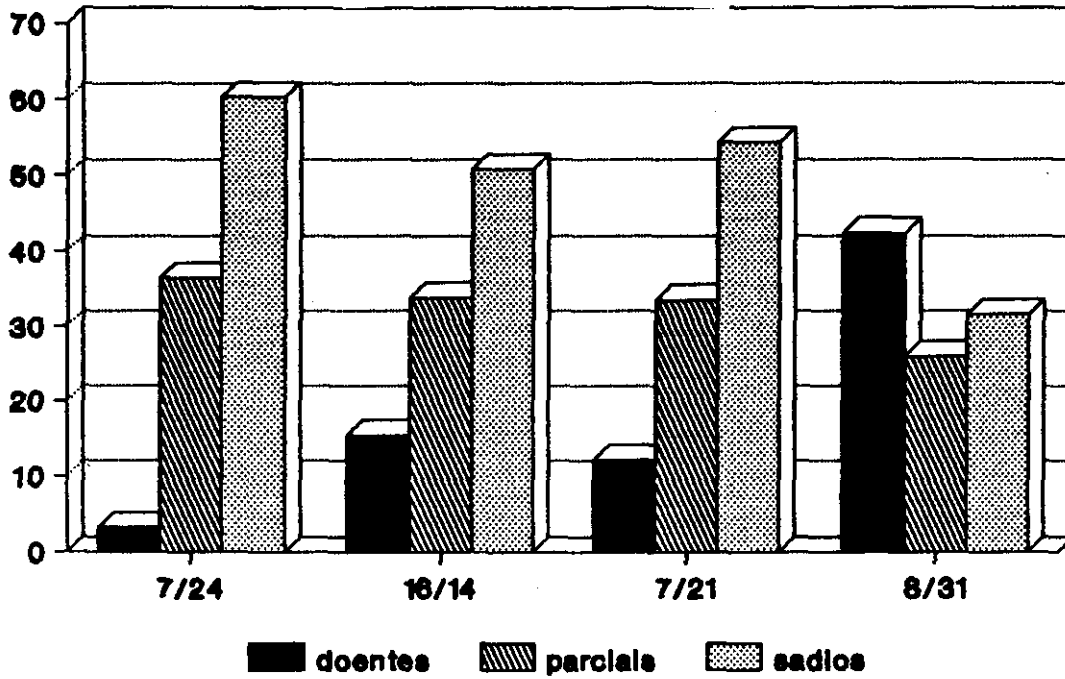
Os mutantes não patogênicos isolados, três a partir de tratamento com NTG e um com UV, apresentaram diferenças quanto à interação com a planta, com variação da porcentagem de virulência residual apresentada por cada linhagem (ver Tabelas 5 e 6 e Figuras 5 e 6). Isso sugere a possibilidade de ocorrência de mais de um tipo de mutação, possibilitando que essas linhagens sejam classificadas em diferentes grupos de mutantes não patogênicos, à semelhança do que foi feito por outros autores (Daniels *et al.*, 1984 ; Arlat & Boucher, 1991; Shaw *et al.*, 1988).

Deve ser observado, no entanto, que diferentes tipos de testes de patogenicidade aplicados às mesmas linhagens podem sugerir diferentes classificações destas entre si. Por outro lado, os resultados obtidos para cada linhagem em diferentes tipos de testes, se comparados entre si, parecem confirmar a mutação da linhagem. Isto é, mesmo que a porcentagem de virulência residual varie dentro de uma mesma linhagem de acordo com o tipo de teste aplicado, isso pode confirmar se ocorre alteração considerável no padrão de interação desta com a planta. Isso pode ser observado na Figura 18.

SEEDLING



SEMENTES



■ doentes ▨ parciais ▩ saudos

Figura 18. Diagrama em barras, mostrando o comportamento dos mutantes de patogenicidade de *Xcv* 479/Nal em dois tipos de testes aplicados, evidenciando as diferenças dos mutantes entre si, em cada teste, e de cada linhagem individualmente, nos diferentes testes.

Se considerado o teste em "seedlings" para a classificação dos mutantes, podem ser destacadas nitidamente duas classes de mutantes :

1. mutantes que apresentaram uma porcentagem de plantas inoculadas sadias na faixa de 70 - 75%, indicando uma redução da virulência. As linhagens 7/21 e 8/31 pertencem a esse grupo.

2. mutantes que apresentaram uma porcentagem de indivíduos sadios acima de 90%, mostrando uma taxa de virulência residual bastante baixa. Os mutantes 7/24 e 16/14 se enquadram nesse grupo.

Entretanto, se considerado o teste em sementes, pode-se observar praticamente três classes de mutantes:

1. mutante que apresentou a menor porcentagem de plantas doentes (cerca de 3%), apresentando praticamente a mesma proporção de plantas doentes obtida nos testes em "seedlings". É representada pela linhagem 7/24.

2. constituída por duas linhagens que mostraram respostas bastante próximas, como pode ser observado na Figura 18, os mutantes 7/21 e 16/14.

3. mutante que apresentou uma alta porcentagem de plantas doentes e parcialmente doentes, linhagem 8/31.

Como dito anteriormente, de forma geral os dados obtidos para cada mutante em diferentes tipos de testes mostraram coerência, exceto quanto à linhagem 7/21, que apresentou maior porcentagem de plantas doentes no teste em "seedling" do que no teste em sementes, ao contrário das outras linhagens, cuja porcentagem de plantas doentes aumentou nesse segundo tipo de teste.

Isso pode sugerir a ocorrência de mutação em diferentes genes envolvidos na patogenicidade. Se forem consideradas as diferenças que ocorrem quanto à resposta induzida pelos mutantes em testes em "seedlings" e sementes, seria possível sugerir a existência de genes de patogenicidade que ajam preferencialmente em determinados estágios do desenvolvimento ou em determinados tecidos da planta. Considerando-se que o inóculo, no teste em sementes, é feito num estágio bastante precoce do desenvolvimento da planta, e que os sintomas começam a se manifestar, em geral a partir da folha, enquanto que em "seedlings" o inóculo ocorre num estágio um pouco mais adiantado do desenvolvimento e os sintomas quase sempre começam pelo caule, essa hipótese pode ser sugerida. O(s) gene(s) mutado(s) em cada linhagem poderia(m) ser essencial(is) nas condições em que se efetua um dos testes, com

relação ao estágio de desenvolvimento e preferência por determinados tecidos da planta, mas dispensável nas condições do outro teste, gerando algumas das diferenças de resposta constatadas aqui.

Outra explicação, que encontra suporte em Klement *et al.* (1990), é de que a técnica de inóculo não tenha sido a mais apropriada para o tipo de doença causada por *Xcv*, gerando uma porcentagem de plantas que estivessem expressando sintomas atípicos. No caso, isso se aplicaria mais especificamente ao teste em planta adulta, cujo inóculo por aspersão de suspensão bacteriana na superfície inferior da folha poderia ser mais indicado para doenças como a mancha bacteriana do que a técnica de infiltração.

Alternativamente, o gene mutado, devido ao tipo de mutagênico utilizado, poderia estar expressando certa função residual. Esse tipo de ocorrência tem sido registrada quanto ao NTG e UV (Klement *et al.* 1990). Nesse caso, poderia ocorrer uma acentuação dessa função residual de acordo com o tipo de teste utilizado.

Não se pode descartar, ainda, a possibilidade de ocorrência de variação individual, entre as plantas testadas, quanto à susceptibilidade ao patógeno, desde que não foram utilizadas linhagens de plantas isogênicas nos experimentos.

3. CARACTERIZAÇÃO DOS MUTANTES

O fato de que todas as linhagens mutantes mostraram-se prototróficas exclui a possibilidade de que a redução da virulência tenha ocorrido devido a deficiência na síntese de algum requerimento nutricional.

Além disso, os mutantes mostraram uma taxa de crescimento igual à da linhagem selvagem, o que evidencia que a alteração na virulência dos mutantes não deve ser devido a diferenças na velocidade de reprodução das células, o que levaria a um atraso no ciclo de vida da bactéria, atrasando a expressão da patogenicidade por alteração de fatores que não têm relação com o processo patogênico.

Quanto à produção de enzimas extracelulares, os mutantes mostraram produção de amilase, protease, celulase, pectinase e lipase, além de excreção normal dessas enzimas. Essas enzimas têm sido relacionadas ao processo de patogenicidade em outros patógenos, como *X. c. pv. campestris* (Daniels *et al.*, 1988), onde foi demonstrado que, isoladamente, essas enzimas têm papel reduzido na patogenicidade, embora mutantes defectivos em mais de uma dessas funções perdem a patogenicidade (Dow *et al.*, 1989). Em outras bactérias fitopatogênicas, como *Pseudomonas*, foi demonstrado que enzimas extracelulares também não têm um papel

indispensável no desenvolvimento da doença (Schell *et al.*, 1988; Roberts *et al.*, 1988), podendo, entretanto, contribuir para o processo. Em *Erwinia*, por outro lado, foi demonstrado que enzimas pécticas têm um papel crucial na patogenicidade, dado que mutantes defectivos na produção de pectinases são, em geral, não patogênicos.

Em *Xcv*, Beaulieu *et al.* (1991) relataram que enzimas pécticas não têm função aparente na patogenicidade. Seal *et al.* (1990) isolaram um mutante não patogênico de *Xcv* que não apresentou deficiência na produção de enzimas extracelulares. Assim, os dados apresentados aqui parecem concordar com a evidência de que essas enzimas não desempenham papel relevante no processo patogênico de *Xcv*.

Nos testes de hipersensibilidade realizados em plantas não hospedeiras, todas as linhagens mostraram-se positivas quanto a essa característica, demonstrando que o gene mutado não é do tipo *hrp*. Em *X. c. pv. vesicatoria*, Bonas *et al.* (1991) localizaram uma região de aproximadamente 25.0 Kb que contém um "cluster" de seis genes, designados *hrpA* a *hrpF*. Foi demonstrado que alteração em qualquer um desses genes leva a bactéria a perder a capacidade de indução de hipersensibilidade em plantas não hospedeiras. Isso sugere a exclusão da hipótese de que os mutantes aqui obtidos tenham sofrido mutação em um desses genes,

levando à suposição de que a mutação tenha ocorrido região do genoma distinta daquela descrita por esses autores.

4. CONSTRUÇÃO DE UM BANCO GENÔMICO DE *Xcv* 317

O tamanho médio de inserto obtido neste trabalho, cerca de 6.0 Kb, está abaixo do esperado em vista do vetor utilizado, que pode inserir fragmentos variando de 2.0 a 28.0 Kb (De Feyter *et al.*, 1990). Swarup *et al.* (1991) descreveram a obtenção de fragmentos de tamanho médio de 22.5Kb, a partir de uma amostragem de 18 clones de um banco genômico de *X. c. pv. citri* construído em pUFRO27.

Na amostragem de 35 clones feita neste trabalho, poucos apresentaram fragmentos maiores do que o vetor. Considerando-se que foram utilizados, teoricamente, fragmentos variando de 2.0 a 20.0 Kb na construção do banco de *Xcv* 317, podem ter ocorrido limitações na etapa de transformação, quando da introdução das moléculas recombinantes para *E. coli* DH5a, uma vez que a eficiência de transformação diminui à medida que aumenta o tamanho da molécula a ser introduzida. Algumas técnicas que aumentam a eficiência de transformação, como a eletroporação, foram tentadas com esse plasmídeo (White & Gonzalez, 1991), utilizando-se *X. c. pv. oryzae* como receptora, mas nas condições em

que os autores desenvolveram os experimentos não foram obtidos transformantes do patovar *X. c. pv. vesicatoria*, de forma que optou-se pela não utilização dessa técnica.

Outro fator que poderia estar interferindo no tamanho médio dos insertos que se ligaram ao vetor é a técnica de purificação dos fragmentos, com a utilização do Geneclean. O Geneclean pode levar à quebra de fragmentos maiores, gerando moléculas que tenham perdido uma das extremidades coesivas, limitando a quantidade de fragmentos com maior número de pares de bases disponíveis para se ligar ao vetor.

Poderia ser considerada outra possibilidade, ainda: a de que os insertos maiores tenham sido circularizados durante a ligação, ao invés de ligar-se ao vetor. As moléculas resultantes dessas ligações poderiam até ter sido transformadas para *E. coli*, mas não teriam como ser selecionadas, devido à ausência de marcadores, dificultando a constatação desse tipo de ocorrência.

Apesar dessas considerações, entretanto, o banco genômico construído neste trabalho, apresentou uma probabilidade entre 90 e 91% de estar representando todo o genoma da bactéria, o que foi considerado satisfatório.

5. COMPLEMENTAÇÃO DO MUTANTE DE *Xcv* 479/*Nal*^r E DA LINHAGEM DE 289/*Nal*^r *Xcma* COM O BANCO GENÔMICO DE *Xcv* 317.

5.1. Mutante 7/24

Os quatro clones que apresentaram complementação positiva quanto à patogenicidade dessa linhagem apresentaram um comportamento muito parecido quanto à porcentagem de plantas infectadas nos testes em "seedling" (mais de 80%), contrastando com o que havia sido anteriormente descrito para o mutante 7/24 (pouco mais de 3% de plantas doentes). A restauração da patogenicidade do mutante, entretanto, não o levou a atingir o mesmo nível de virulência do selvagem, o que está em concordância com dados mostrados por outros autores (Niepold *et al.*, 1985; Shaw *et al.*, 1988; Seal *et al.*, 1990). Não seria esperado que isso fosse decorrência de instabilidade do vetor pUFR027 em *X. c. pv. vesicatoria*, desde que De Feyter *et al.* relataram retenção acima de 99% para esse plasmídio após 36 gerações de crescimento em meio de cultura. Entretanto, o comportamento desse vetor *in planta* não foi determinado para *Xcv*, embora dados disponíveis para *X. c. pv. malvacearum* mostrem que, sob determinadas condições, bactérias recuperadas após 10 dias de infecção apresentam 94% de retenção do plasmídio. Isso

sugere que possa ocorrer, em Xcv, uma alteração da estabilidade do plasmídio quando a bactéria cresce *in planta*, explicando a diferença acima citada.

Alternativas possíveis dessa suposição seriam variações decorrentes da própria técnica de inóculo ou variação individual entre as plantas testadas quanto à susceptibilidade ao patógeno, como já citado anteriormente.

Quando dois desses clones, pVE7241 e pVE7242, foram testados em sementes, apresentaram respostas um pouco diferentes entre si, contrastando com o que foi observado em teste de "seedling", onde mostraram respostas praticamente idênticas. Isso evidencia mais uma vez que a aplicação de diferentes tipos de testes de patogenicidade às mesmas linhagens pode ser uma maneira de diferenciá-las entre si, ao mesmo tempo que pode ou não confirmar a alteração demonstrada em um dos tipos de testes aplicados. Neste caso, o padrão de interação apresentado pelo clone pVE7241 em "seedling" foi confirmado pelo teste em sementes, enquanto o clone pVE7242 mostrou um comportamento semelhante ao mutante 7/21 quanto a esse teste, ou seja, a virulência foi aparentemente menor quando em sementes, ao contrário do que tem sido observado na maioria dos casos.

Deve ser ressaltado, porém, que estes resultados são preliminares, devendo ser efetuados outros testes tanto em "seedlings" quanto em sementes com esses

clones, além de análises em planta adulta, para uma verificação definitiva desses dados.

Os dados apresentados levam à suposição de que os fragmentos contidos nos clones que complementaram o mutante 7/24 contém, provavelmente, um gene do tipo *dsp*, isto é, envolvido na determinação da doença na planta hospedeira, mas que não interfere com a indução de resposta de hipersensibilidade em plantas não hospedeiras. Esses dados mostram algumas similaridades com aqueles obtidos por Seal *et al.* (1990), que descreveram o isolamento de uma região de aproximadamente 22.0 Kb que foi capaz de restaurar a patogenicidade de um mutante de *Xcv* induzido por transposon Tn5. Esses autores isolaram um mutante que se mostrou prototrófico, com a mesma taxa de crescimento *in vitro* que a linhagem selvagem, sem alteração de morfologia de colônia, produtor de protease, amilase, celulase e capaz de induzir resposta de hipersensibilidade em tabaco.

Daniels *et al.* (1984b) identificaram uma região do genoma de *X.c. pv. campestris* (posteriormente identificada por Turner *et al.* (1985) como um "cluster" de cerca de 10.0 Kb) envolvida na patogenicidade dessa bactéria. Não foi identificado o(s) produto(s) codificado(s) por essa sequência, mas esta não foi classificada dentro dos grupos de genes atualmente descritos, embora sua correlação direta com o fenótipo

de patogenicidade possa sugerir que essa sequência contenha genes do tipo *dsp.*, apesar de não terem sido feitas análises quanto à indução de hipersensibilidade em plantas não hospedeiras.

Neste trabalho, a análise dos fragmentos dos quatro clones positivos quanto ao tamanho em pares de bases evidenciou uma variação de fragmentos entre ca. 3.0 a 5.0 Kb, dependendo do clone analisado (Fig. 11). O clone pVE7244, que não aparece na foto, libera um fragmento estimado em 3.0 Kb.

O fato de mais de um clone estar complementando o mutante leva a dois caminhos. Pode ser que todos os clones contenham um mesmo fragmento, ou fragmentos homólogos capazes de complementar o mutante. Nesse caso, esse fragmento teria um tamanho inferior a 3.0 Kb, que é o tamanho do menor fragmento que complementou a mutação e não apresentaria sítio de restrição para *EcoRI*. Seal *et al.* (1990), utilizando fragmentos de restrição de uma região de 22.0 Kb que complementou um mutante não patogênico de *Xcv*, identificaram 17 clones do banco genômico que mostraram homologia com as sequências utilizadas como sonda. Testados quanto à complementação da virulência do mutante, 8 clones mostraram complementação positiva e dado que esses clones foram selecionados por homologia de sequência, isso sugere que se refiram a complementação de um mesmo locus gênico. No caso dos clones obtidos neste

trabalho, poderia ser feito um perfil de restrição com diversas enzimas, para verificação da ocorrência de liberação de algum fragmento comum, ou uma hibridização utilizando-se o menor deles como sonda, para verificar a existência de homologia entre os clones, o que poderia demonstrar ou não se todos carregam um mesmo fragmento capaz de complementar o mutante.

Se, entretanto, essa abordagem não revelasse homologia entre os clones, poderia estar acontecendo mutação em mais de um locus gênico. Sabe-se que genes de patogenicidade frequentemente estão organizados em "cluster" no genoma (Turner *et al.*, 1985; Bonas *et al.*, 1990) e poderia ter sido causada uma mutação que atingisse loci adjacentes, de forma que o mutante fosse defectivo em mais de uma função gênica. Essa mutação envolvendo mais de um gene seria a responsável pelo fenótipo não patogênico apresentado pelo mutante, de forma que a complementação de apenas um dos loci mutados fosse suficiente para restaurar a patogenicidade. Isso explicaria como diferentes clones poderiam estar complementando um mesmo mutante.

Em *X. c. pv. campestris*, um modelo não muito distante do proposto acima foi observado quanto à deficiência na produção de enzimas extracelulares envolvidas na degradação de compostos da planta. O papel de cada enzima na patogenicidade foi verificado isoladamente, demonstrando que nenhuma delas é

essencial à patogenicidade. Entretanto, mutantes defectivos na síntese ou excreção de várias dessas enzimas mostraram-se não patogênicos (Daniels *et al.*, 1984; Dow *et al.*, 1987), e a restauração de produção de alguma dessas enzimas poderia recuperar a virulência do patógeno.

Permanece por ser esclarecido, portanto, qual das suposições acima é a que se aplica a esse caso.

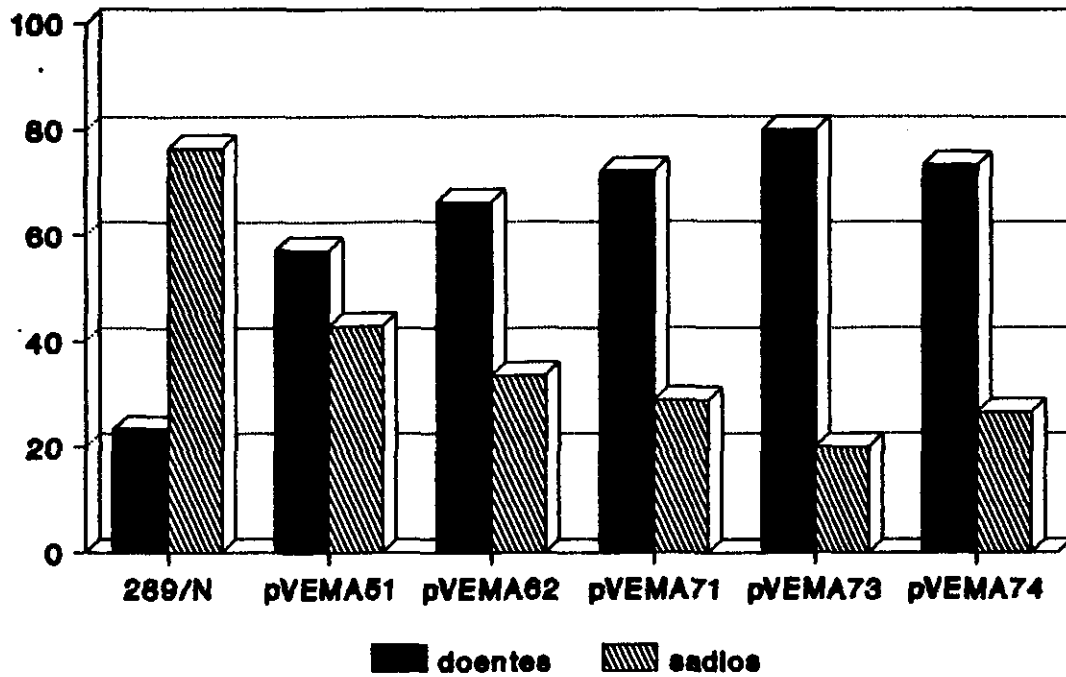
5.2. *Xcma* 289/Nal^r

Os resultados de cruzamento de uma linhagem de *Xcma*, não patogênica para tomate, com um banco genômico de *Xcv* 317, sugerem a existência de algum determinante positivo no reconhecimento entre *Xcv* e tomate, seu hospedeiro, que poderia ser codificado por genes do tipo *hsv*. Foram identificados, entre os clones derivados desse cruzamento, 5 clones que apresentaram virulência aumentada em tomate, com relação à linhagem 289/Nal original, após etapas sucessivas de seleção em tomate. Após teste em "seedlings" com esses clones, foram observados 3 clones que continuaram mostrando-se com diferença mais acentuada com relação ao controle negativo (Figura 19).

O tipo de abordagem desenvolvida foi tentada por outros autores (Sawczyk *et al.*, 1989), que relataram a

HIPOCÓTILO

111



SEEDLING

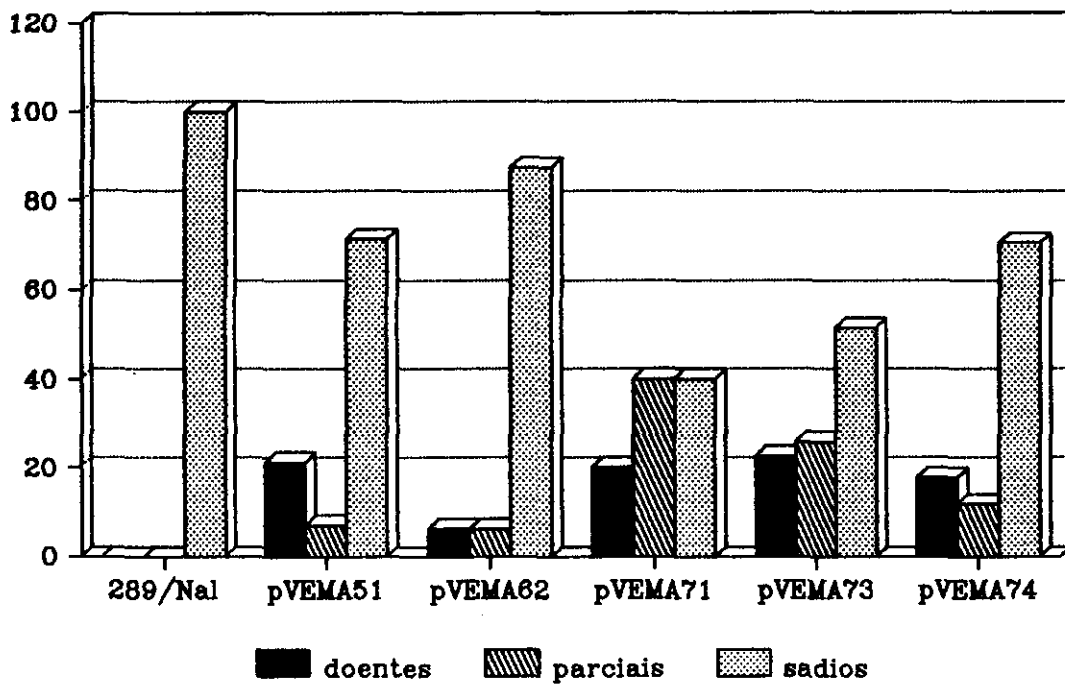


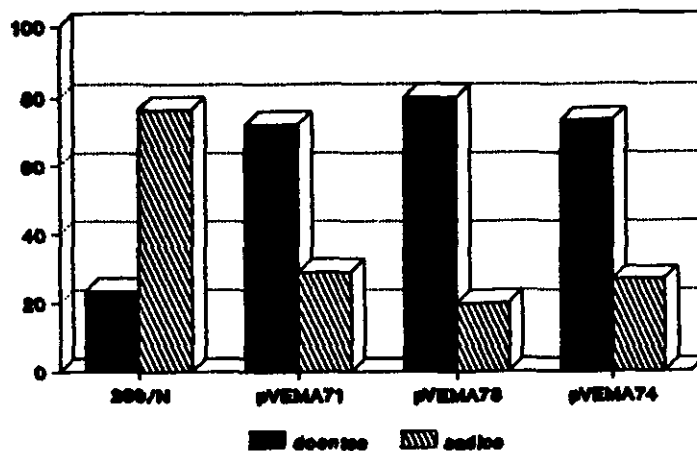
Figura 19. Diagrama em barra mostrando o comportamento dos clones de *Xcma* 289/NaI^r, complementada com o banco genômico de *Xcv* 317, apresentando alteração da virulência em tomate.

transferência de um banco genômico de *X. c. pv. campestris* (*Xcc*) para *X. c. pv. translucens* (*Xct*), e vice-versa. Os transconjugantes foram testados em trigo e nabo, de forma que *Xcc* contendo o banco genômico de *Xct* fossem inoculados em trigo, para verificar se ocorreria alteração de especificidade ao hospedeiro, e clones de *Xct* contendo o banco de *Xcc* fossem inoculados em nabo, com o mesmo fim. Não ocorreu alteração de especificidade ao hospedeiro em nenhum dos casos testados, isto é, não houve o aparecimento de plantas doentes a partir desses experimentos.

Os dados obtidos neste trabalho contrastam com os resultados de Sawczyk *et al.* (1989). Os três clones mais virulentos demonstraram que a introdução de DNA heterólogo de um patógeno de tomate (*Xcv*) em um patógeno de mandioca (*Xcma*) fez com que este último, por mecanismos não conhecidos, passasse a reconhecer o tomate como hospedeiro, levando ao desenvolvimento de sintomas nesta espécie de planta, em três tipos de testes de patogenicidade realizados (Figura 20).

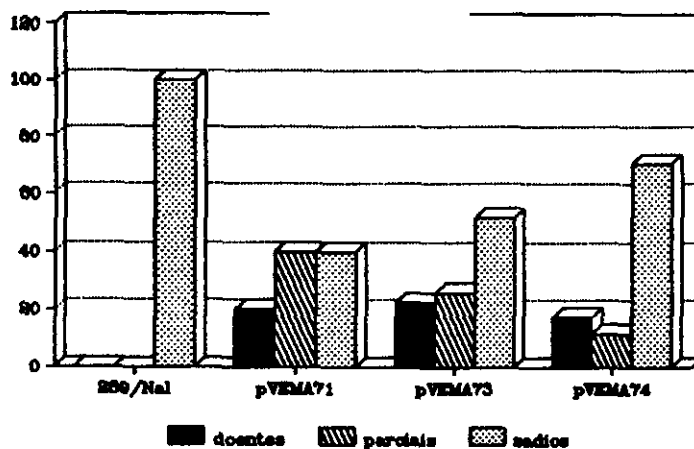
Não se pode afirmar com certeza que essa alteração foi decorrente da introdução de algum locus do tipo *hsv* sem que sejam efetuados experimentos complementares. Se faz necessária a realização de uma série de testes de patogenicidade com os clones obtidos, especialmente os clones pVEMA71, pVEMA73 e pVEMA74, para uma confirmação definitiva do tipo de interação e melhor

HIPOCÓTILO



113

SEEDLING



SEMENTES

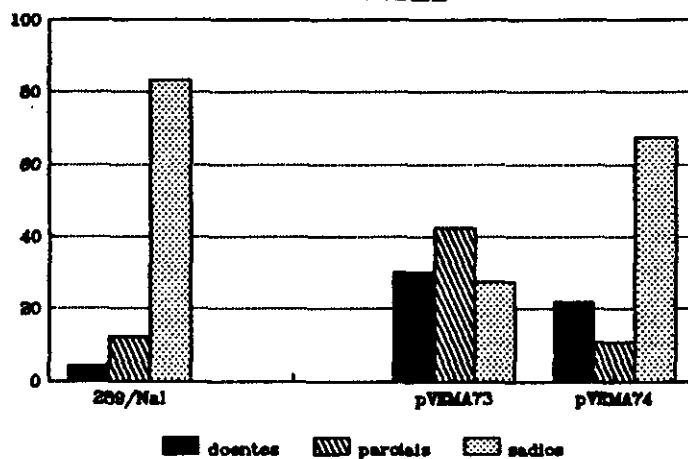


Figura 20. Diagrama em barra, evidenciando, através dos resultados em 3 diferentes tipos de testes de patogenicidade, a interação de virulência entre os 3 clones de *Xcma* 289/Nal^r que apresentaram as melhores respostas nos testes e o tomate.

caracterização desses clones quanto à patogenicidade em tomate. Testes em planta adulta envolvendo esses clones poderiam dar uma idéia mais clara da alteração no padrão de interação entre *Xcma* e tomate. Deverá ser feita, paralelamente, a análise molecular dos fragmentos obtidos, com sequenciamento e comparação da sequência com banco de dados para a identificação do produto gênico envolvido.

Até o momento, um único locus *hsv* foi descrito em *Xanthomonas*, em *X. c. pv. translucens*, que apresenta ampla gama de hospedeiros. Genes *hsv* em patovares que, a princípio, apresentam uma gama restrita de hospedeiros, ainda não foram descritos.

X. c. pv. vesicatoria se enquadra nessa categoria. Entretanto, estudos mais detalhados quanto à relação exata de hospedeiros de cada patovar de *Xanthomonas* precisam ser realizados, dado que ocorre reação compatível entre alguns patovares e plantas que não são classificadas como seus hospedeiros. Isso foi constatado por Daniels *et al.* (1984a), que demonstrou que *X. c. pv. vesicatoria* pode causar doença em crucíferas, normalmente atacadas pelo patovar *campestris*. Da mesma forma, em experimentos realizados com hipocótilos, foi observado que *X. c. pv. campestris* levou hipocótilos de tomate à necrose total, demonstrando grau de severidade, dentro desse teste, muito próximo ao de *Xcv* (dados não mostrados). Assim,

não se pode assumir sem questionamento a classificação de um patógeno como pertencente a um grupo com ampla gama de hospedeiros ou com número restrito de hospedeiros, sem que se tenha por base estudos dessa natureza.

Assim, embora Xcv apresente um mecanismo bastante elaborado de reconhecimento de hospedeiro a nível de raça-cultivar, pode ser considerada a hipótese de que ocorra um mecanismo diferente quanto ao reconhecimento a nível de espécie e gênero de hospedeiros, envolvendo algum fator positivo na determinação da especificidade. Waney *et al.* (1991) sugeriram que genes do tipo *hsv* estejam envolvidos na determinação de especificidade ao hospedeiro a esses níveis.

Entretanto, embora menos provável, não pode ser descartada a possibilidade de que tenha sido clonado algum gene regulador de genes de patogenicidade, causando uma superexpressão da patogenicidade de Xcma 289/Nalr, levando essa linhagem a induzir o aparecimento de sintomas atípicos em tomate. Mesmo a clonagem de um gene que determine a produção de algum fator envolvido na patogenicidade poderia causar esse efeito, devido a uma elevação da quantidade de algum composto ligado a mecanismos gerais de patogenicidade, por exemplo, de tal forma que mesmo um patógeno não específico poderia causar lesões à planta. Isso poderia ser checado testando-se esses clones em outros

hospedeiros, para verificar se a indução de sintomas por *Xcma* em tomate é específica ou seria reflexo de uma espécie de "efeito de dose".

Os mecanismos envolvendo a expressão da virulência dos clones de *Xcma* contendo DNA heterólogo de *Xcv* em tomate deverão ser elucidados após a concretização dos experimentos complementares sugeridos acima.

CONCLUSÕES

Podem ser destacadas as seguintes conclusões:

1. O NTG mostrou-se um mutagênico mais poderoso do que a UV, com uma frequência de mutação 10 vezes maior, nas condições testadas.
2. Foram obtidos 4 mutantes não patogênicos de *Xcv* 479/Nal, 3 induzidos por NTG e um por UV.
3. Ocorre diferença na interação entre a planta e as linhagens mutantes, de acordo com o tipo de teste de patogenicidade realizado.
4. O teste que se mostrou mais drástico quanto à infecção foi o teste em sementes. O teste em "seedling" foi considerado o melhor dentre os testes utilizados, por ser rápido e simples, permitindo a seleção de grande número de colônias. O teste em hipocótilos também é bastante rápido e simples, mas não mostrou-se um teste seguro para a seleção de mutantes, devido à gravidade da lesão e quantidade de inóculo, o que facilita muito a infecção pelo patógeno específico da planta, mesmo em se tratando de mutantes com alteração na virulência.

5. Os testes de patogenicidade propostos neste trabalho, em "seedlings" seccionados e em hipocótilos, estes mostraram-se viáveis para a seleção de grande número de colônias. Embora o teste em hipocótilos, como observado acima, não seja um teste seguro para a seleção de mutantes, mostrou-se muito eficaz nas condições em que foi desenvolvido. O teste em "seedlings" seccionados foi o responsável pela seleção inicial do mutante de UV descrito anteriormente.

6. Os mutantes isolados mostraram-se prototróficos; produziram enzimas extracelulares como lipase, amilase, protease, celulase e pectinase, bem como mostraram-se capazes de excretar essas enzimas para o meio; apresentaram taxa de crescimento praticamente idêntica à da selvagem.

7. O(s) gene(s) contido (s) nos fragmentos clonados não são do tipo *hrp*, dado que, mesmo com a patogenicidade em tomate alterada, continuaram induzindo reação de hipersensibilidade em tabaco.

8. O banco genômico de *Xcv* 317 mostrou-se teoricamente com representatividade aproximada de 90.5%.

9. O mutante 7/24 foi o que apresentou a resposta mais clara quanto à alteração de virulência, sendo por isso escolhido para a complementação com o banco genômico.

10. A complementação positiva do mutante 7/24 com o banco de *Xcv* 317 mostrou que as sequências que complementaram o clone estão contidas em fragmentos de 3.0 Kb a 5.0 Kb, aproximadamente.

11. A complementação da linhagem *X. c. pv. manihotis* 289/Nal^r com o banco genômico de *Xcv* 317 levou à identificação de 3 clones que mostraram virulência a plantas de tomate, em três tipos de teste efetuados : hipocótilos, "seedlings" e sementes.

12. Ocorreu alteração da especificidade ao hospedeiro de *Xcma*, patógeno de mandioca, quanto ao tomate, a partir da introdução de DNA heterólogo de patógeno de tomate, *Xcv* 317.

13. Os clones positivos identificados nesses experimentos apresentaram fragmentos de 2.3, 6.0 e 2.3 Kb. Apesar da resposta de patogenicidade induzida pelos clones que apresentaram o mesmo tamanho de fragmento ter sido bastante próxima em hipocótilos e "seedlings", não se pode afirmar que sejam o mesmo clone, especialmente porque esses clones, quando crescidos em

meio sólido, apresentam morfologia de colônia muito diferente.

PERSPECTIVAS

Os resultados deste trabalho abrem algumas possibilidades de pesquisa, visando a complementação de dados aqui obtidos ou uma investigação mais detalhada do que poderia se caracterizar em resultados preliminares, em alguns experimentos. Podem ser sugeridos:

1. Caracterização dos fragmentos que apresentaram complementação positiva do mutante não patogênico quanto ao perfil de restrição com várias enzimas, ou análises de hibridização dos mesmos, evidenciando se os diferentes clones obtidos apresentam ou não o mesmo fragmento.
2. Complementação dos outros mutantes, especialmente 16/14, induzido por UV, com os clones que complementaram o mutante 7/24, para verificar se a mutação nas demais linhagens ocorreu no mesmo locus do mutante 7/24.
3. Se não houver complementação e for verificada a ocorrência de mutação em outro locus, complementar os demais mutantes com o banco genômico, o que permitiria a identificação de outros genes envolvidos na patogenicidade de *Xcv*.

4. Utilização do banco genômico de *Xcv* 317 nos mais variados estudos de patogenicidade em bactérias do gênero *Xanthomonas*.

5. Mapeamento por deleção com enzimas de restrição ou por transposição com Tn5 dos fragmentos obtidos, para localização da região funcional capaz de complementar a mutação.

6. Sequenciamento dos fragmentos citados acima e comparação das sequências com informações disponíveis em banco de dados, para verificação de homologia com alguma proteína cuja função seja conhecida, na tentativa de se identificar como o gene em questão poderia agir no processo patogênico.

7. Quanto aos clones que demonstraram complementação positiva em *Xcma*, levando esse patógeno de mandioca a desenvolver sintomas em tomate, estes poderão ser conjugados com outros patovares de *X. campestris* que também não causem dano em tomate, como *glycines*, *passiflorae*. Dessa forma, poderá ser verificado se esse patovares passarão a mostrar-se patogênicos em tomate a partir de introdução de DNA heterólogo de *Xcv* 317, o que poderia demonstrar que esses fragmentos realmente carregam algum gene de especificidade ao hospedeiro (*hsv*).

8. Paralelamente, poderá ser feito o sequenciamento dos fragmentos dos clones que levaram *Xcma* a induzir sintomas em tomate, com o mesmo objetivo citado acima para os fragmentos que complementam o mutante 7/24.

9. Após a caracterização dos genes através de mapeamento e sequenciamento, estes poderão servir como sonda na identificação de sequências homólogas em outros patovares de *X. campestris*.

10. Poderão ser realizados experimentos de complementação com os mutantes brancos obtidos a partir de mutagênese com NTG, permitindo a identificação de genes envolvidos na produção do pigmento xantomonadina, bem como a investigação da função desse pigmento durante o processo de infecção da planta.

RESUMO

A linhagem 479/Nal^r de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv), causadora da mancha bacteriana em tomate e pimentão, foi tratada com nitrosoguanidina (NTG) e luz ultravioleta (UV). Foram isolados 4 mutantes não patogênicos, 3 de NTG, designados 7/21, 7/24, 8/31 e 1 de UV, designado 16/14, identificados através de várias etapas de seleção em diferentes tipos de testes de patogenicidade. Esses mutantes mostraram-se prototróficos, apresentaram a mesma taxa de crescimento que a linhagem selvagem, produziram enzimas extracelulares como amilase, lipase, protease, pectinase e celulase e foram capazes de induzir resposta de hipersensibilidade em tabaco.

Foi construído um banco genômico de Xcv 317 para complementação de mutação quanto à patogenicidade, utilizando-se um plasmídeo, pUFR027 como vetor. Esse banco foi transferido para o mutante 7/24, por conjugação. Dentre os 382 transconjugantes testados quanto à patogenicidade em "seedlings", foram identificados 4 clones que apresentaram complementação positiva. Analisados quanto ao tamanho de inserto responsável pela complementação e foram encontrados fragmentos de, aproximadamente, 4.0 Kb para dois dos clones, e de 5.0 Kb e 3.0 Kb para os demais.

Paralelamente, o banco de *Xcv* 317 foi transferido para *X. c. pv. manihotis* 289/Nal^r (*Xcma*), patógeno de mandioca que não causa qualquer tipo de sintoma em tomate, na tentativa de se identificar algum gene envolvido na especificidade ao hospedeiro.

A partir de 640 transconjugantes obtidos, após várias etapas de seleção em testes em hipocótilos, foram identificados 5 clones que mostraram virulência contra tomate. Após testes em "seedlings", e alguns em sementes, foram identificados 3 clones de *Xcma* que induziram manifestação de sintomas a partir de introdução de DNA heterólogo de *Xcv* 317, sugerindo a identificação de algum gene envolvido na determinação da especificidade ao hospedeiro. Analisados quanto ao tamanho de inserto, esses clones apresentaram fragmentos de 2.3 Kb, 6.0Kb e 2.3Kb, respectivamente.

ABSTRACT

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* is the causal agent of leaf spot on pepper and tomato.

Four non-pathogenic mutants were isolated from the pathogenic strain 479/Nal^r after mutagenesis with NTG and UV. The mutants were screened through different pathogenicity tests. They were prototrophic, showed the same growth rate of the wild type, produced amylase, protease, cellulase, pectinase and lipase and induced hypersensitive response on tobacco.

A genomic library of *X. c.* pv. *vesicatoria* pathogenic strain 317 was used for complementation of non-pathogenic mutants. The plasmid pUFR027 was used as a cloning vector. The genomic bank was introduced in a NTG-induced mutant by triparental conjugation. Four clones that showed positive complementation were isolated, showing inserts of approximately 3.0, 4.0, 4.0 and 5.0 Kb.

The genomic library of *Xcv* 317 was also transferred to *X. c.* pv. *manihotis* strain 289/Nal^r, a non-pathogenic pathovar for tomato, in order to identify a gene involved on host specificity.

Five clones that showed virulence response on tomato were isolated after several tests in hypocotiles. Three clones considered more aggressive were chosen after tests on seedlings and seeds. These

clones showed inserts of approximately 2.3, 6.0 and 2.3 Kb. The results obtained suggest that these inserts can be involved on host specificity determination.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADASKAVEG, J. A. & HINE, R. B. 1985. Copper tolerance and zinc sensitivity of Mexican strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. *Plant Dis.* **69**: 993 - 996.
- ADELBERG, E. A., MANDEL, M. & CHING-CHEN, G. C. 1965. Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl - N'-nitro - N - nitrosoguanidine in *Escherichia coli* K12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **18**: 788 - 795.
- AGRIOS, G. N. *Plant Pathology*. 1989. 3rd Ed. Academic Press, Inc. San Diego, California.
- ANDERSON, D. M. & MILLS, D. 1985. The use of transposon mutagenesis in the isolation of nutritional and avirulence mutants in two pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Phytopathol.* **75**: 104 - 108.
- ARLAT, M. & BOUCHER, C. 1991. Identification of a *dsp* DNA region controlling aggressiveness of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interac.* **4**: 211 - 213.

ARLAT, M., GOUGH, C. L., BARBER, C. E. , BOUCHER, C. & DANIELS, M. J. 1991. *Xanthomonas campestris* contains a cluster of *hrp* genes related to the larger *hrp* cluster of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 4: 593 - 601.

BAUER , D. W. & BEER, S. V. 1991. Further characterization of an *hrp* gene cluster of *Erwinia amylovora*. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 4: 493 - 499.

BEAULIEU, C. , MINSAVAGE, G. V. , CANTEROS, B. I. & STALL, R. E. 1991. Biochemical and genetic analysis of a pectate lyase gene from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 4: 446 -451.

BEAULIEU, C. & VAN GIJSEGEM, F. 1990. Identification of plant-inducible genes in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bacteriol.* 172: 1569 - 1575.

BIRNBOIM, H. C. & DOLY, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Ac. Res.* 7: 1513 - 1523.

- BOCCARA, M. , DIOLEZ, A., ROUVE, M. & KOTOUJANSKY, A.
1988. The role of individual pactate lyases of
Erwinia chrysanthemi strain 3937 in pathogenicity on
saintpaulia plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*33:
95 - 104.
- BONAS , U. , STALL, R. E. & STASKAWICZ, B. 1989.
Genetic and structural characterization of the
avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas* . *Mol. Gen.
Genets.* 218: 127 - 136.
- BONAS, U., SCHULTE, R., FENSELAU, S., MINSAVAGE, G. V.,
STASKAWICZ, B. J. & STALL, R. E. 1991. Isolation of
a gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv.
vesicatoria that determines pathogenicity and the
hypersensitive response on pepper and tomato. *Mol.
Plant-Microbe Inter.*4: 81 - 88.
- BOUCHER, C. A ., VAN GIJSEGEM, F., BARBERIS, P. A.,
ARLAT, M. & ZISCHEK, C. 1987. *Pseudomonas*
solanacearum genes controlling both pathogenicity on
tomato and hypersensitivity in tobacco are
clustered. *J. Bacteriol.* 169: 5626 - 5632.

- BOUCHER, C. , ARLAT, M., ZISCHEK, C. & BOISTARD, P.
1988. Genetic organization of pathogenicity
determinants of *Pseudomonas solanacearum*. In:
*Physiology and Biochemistry of Plant Microbial
Interactions*, 83 - 95. KEEN, N., KOSUGE, T. &
WALLING, L., eds. American Society of Plant
Physiologists, Bethesda, MD.
- BRADBURY, J. F. 1984. *Xanthomonas* Dowson 1939. In:
Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.1.
KRIEG, N. R. & HOLT, eds. The Williams & Wilkins
Co., Baltimore, Maryland.
- BURRIL, T. J., 1878. (Remarks made in a discussion.)
Trans Ill. State Hortic. Soc. (N.S.) 11: 79 - 80.
- CANTEROS, B., MINSAVAGE, G., BONAS. U., PRING. D. &
STALL, R. 1991. A gene from *Xanthomonas campestris*
pv. *vesicatoria* that determines avirulence in tomato
is related to *avrBs3*. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 4:
628 - 632.
- COLLMER, A. & KEEN, N. T. 1986. The role of pectic
enzymes in plant pathogenesis. *Ann. Rev.*
Phytopathol. 24: 383 - 409.

- COPLIN, D. L. 1989. Plasmids and their role in the evolution of plant pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 27: 187 - 212.
- CUPPELS, D. A. 1986. Generation and characterization of Tn5 insertion mutations in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51 : 323 - 327.
- CLARKE, L. & CARBON, J. 1979. Selection of specific clones from colony banks by suppression or complementation tests. *Methods Enzimol.* 68: 396 - 408.
- DAHLBECK, D. & STALL, R. E. 1979. Mutations for change of race in cultures of *Xanthomonas vesicatoria* . *Phytopathol.* 69: 634 - 636.
- DANIELS, M. J., BARBER, C. E., TURNER, D. C., CLEARY, W. G. & SAWCZYC, M. 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. & 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., DOW, J. M. & OSBOURN, A. E. 1988. Molecular genetics of pathogenicity in phytopathogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 26: 285 - 312.
- DANIELS, M. J. 1989. Pathogenicity of *Xanthomonas campestris* towards plants. In: HOPWOOD, D. A. & CAHTER, K. F. ed. *Genetic of Bacterial Diversity*, 1989, Academic Press.
- DE FEYTER, R., KADO, C. I. & GABRIEL, D. W. 1990. Small, stable shuttle vectors for use in *Xanthomonas*. *Gene* 88: 65 - 72 .
- DE FEYTER , R. & GABRIEL, D. W. 1991. At least six avirulence genes are clustered on a 90-kilobase plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 4: 423 - 432.

- DITTA, G., STANFIELD, S., CORBIN, D. & HELINSKI, D. 1980. Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 7347 - 7351.
- DOW, J. M., MILLIGAN, D. E., JAMIESON, L., BARBER, C. E. & DANIELS, M.J.. 1989. Molecular cloning of a polygalacturonate lyase gene from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and role of the gene product in pathogenicity. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 35: 113 - 120.
- DOW, J. M., SCOFIELD, G., TRAFFORD, K., TURNER, P. C. & DANIELS, M. J. 1987. A gene cluster in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* required for pathogenicity controls the excretion of polygalacturonate lyase and other enzymes. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 31: 261 - 271.
- DUMS, F., DOW, J. M. & DANIELS, M. J. 1991. Structural characterization of protein secretion genes of the bacterial phytopathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*: relatedness to secretion systems of other Gram-negative bacteria. *Mol. Gen. Genet.* 229: 357 - 364.

DYE, D. W. & LELLIOT, R. A. 1974. Genus II. *Xanthomonas* Dowson 1939, 187. In: BUCHANAN, R. E. & GIBBONS, N. E. eds., *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland.

FENSELAU, S., BALBO, I. & BONAS, U. 1992. Determinants of pathogenicity in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are related to proteins involved in secretion in bacterial pathogens of animals. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 5: 390 - 396.

GABRIEL, D. W. 1986. Specificity and gene function in plant-pathogen interactions. *ASM News* 52: 19 - 25.

GABRIEL, D. W., BURGESS, A. & LAZO, G. R. 1986. Gene-for-gene interactions of five cloned avirulence genes from *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* with specific resistance genes in cotton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6415 - 6419.

GABRIEL, D. W. & ROLFE, B. G. 1990. Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. *Ann. Rev. Phytopathol.* 28: 365 - 391.

- GHOLSON, R. K. & ESSENBERG, M. 1986. An extracellular protease-deficient mutant of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* maintains its pathogenicity to cotton. *Phytopathol.* 76: 1140.
- GOUGH, C. L., DOW, J. M., BARBER, C. E. & DANIELS, M. J. 1988. Cloning of two endoglucanase genes of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: Analysis of the role of the major endoglucanase in pathogenesis. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 1: 275 - 281.
- GOUGH, C. L., GENIN, S., ZISCHEK, C. & BOUCHER, C. 1992. *hrp* genes of *Pseudomonas solanacearum* are homologous to pathogenicity determinants of animal pathogenic bacteria and are conserved among plant pathogenic bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 5: 384 - 389.
- HU, N. T., HUNG, M., CHIOU, S., TANG, F., CHIANG, D., HUANG, H. & WU, C. 1992. Cloning and characterization of a gen required for the secretion of extracellular enzymes across the outer membrane by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J. Bacteriol.* 174: 2679 - 2687.

- HUANG, Y., XU, P. & SEQUEIRA, L. 1990. A second cluster of genes that specify pathogenicity and host response in *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 3: 48 - 53.
- HWANG, I., LIM, S. M. & SHAW, P. D. 1992. Cloning and characterization of pathogenicity genes from *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*. *J. of Bacteriol.* 174: 1923 - 1931.
- JEANES, A., PITTSLEY, J. E. & SENTI, F. R. 1961. Polysaccharide B-1459: a new hydrocolloid polyelectrolyte produced from glucose by bacterial fermentation. *J. Appl. Polymer. Sci.* 5: 519 - 526.
- KAMOUN, S. & KADO, C. I. 1990. A plant-inducible gene of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* encodes an extracellular component required for growth in the host and hypersensitivity on nonhosts. *J. Bacteriol.* 172: 5165 - 5172.
- KEEN, N. T. 1990. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Ann. Rev. Genet.* 24: 447 - 463.

- KEEN, N. T. & STASKAWICZ, B.J. 1988. Host range determinants in plant pathogens and symbionts. *Ann. Rev. Microbiol.* 42: 421 - 440.
- KEARNEY, B., RONALD, P., DAHLBECK, D. & STASKAWICZ, B. 1988. Molecular basis for evasion of plant host defence in bacterial spot disease of pepper. *Nature* 332: 541 - 543.
- KEARNEY, B. & STASKAWICZ, B. 1990a. Characterization of IS476 and its role in bacterial spot disease of tomato and pepper. *J. of Bacteriol.* 172: 143 - 138.
- KEARNEY, B. & STASKAWICZ, B.J. 1990b. Widespread distribution and fitness contribution of *Xanthomonas campestris* avirulence gene *avrBs2*. *Nature* 346: 385-386.
- KELEMU, S. & LEACH, J. E. 1990. Cloning and characterization of an avirulence gene from *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*.
- KLEMENT, Z. 1982. Hypersensitivity. In: *Phytopathogenic prokariotes*, Vol 2 : MOUNT, M. S. & LACY, G. S., eds. Academic Press, New York.

- KLEMENT, Z., RUDOLPH, K. & SANDS, D. C., eds. 1990. *Methods in phyto bacteriology*. Akademiai Kiado, Budapest.
- KNOOP, V., STASKAWICZ, B. & BONAS, U. 1991. Expression of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is not under the control of *hrp* genes and is independent of plant factors. *J. of Bacteriol.* 173: 7142 - 7150.
- KOTOIJANSKY, A. 1987. Molecular genetics of pathogenesis by soft-rot erwinias. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25: 405 - 430.
- LEONG, S. A. , DITTA, G. S. & HELINSKI, D. R. 1982. Heme biosynthesis in *Rhizobium*. Identification of a cloned gene coding for α -amino - levulinic acid synthetase from *Rhizobium meliloti*. *J. Biol. Chem.* 257: 8724 - 8730.
- LEYNS, F., DE CLEENE, M., SWINGS, J. G. & DE LEY, J. 1984. The host range of the genus *Xanthomonas*. *The Botan. Rev.* 50: 308 - 356.

- LINDGREN, P. B. , PEET, R. C. & PANOPOULOS, N. J. 1986.
Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv.
"phaseolicola" controls pathogenicity on bean plants
and hypersensitivity on nonhost plants. *J.*
Bacteriol. 168: 512 - 522.
- MA, Q. S., CHANG, M. F., TANG, J. L., FENG, J. X. ,
FAN, M. J., HAN, B. & LIU, T. 1988. Identification
of DNA sequences involved in host specificity in the
pathogenesis of *Pseudomonas solanacearum* strain
T2005. *Mol. Plant-Microbe Interac.*1: 169 - 174.
- MALIGA, P., SZ-BREZNOVITS, A. & MARTON, L. 1973.
Streptomycin resistant plants from callus culture of
haploid tobacco. *Nature* 244: 29 -30.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E. F. & SAMBROOK, J. 1982.
Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring
Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.,
USA.
- McCAMMON, S. L. , COPLIN, D. L. & ROWAN, R. G. 1985.
Isolation of avirulent mutants of *Erwinia stewartii*
using bacteriophage Mu pf7701. *J. Gen. Microbiol.*
131: 2993 - 3000.

- MELLANO, V. J. & COOKSEY, D. A. 1988. Development of host range mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. *App. Environ. Microbiol.* 54: 884 - 889.
- MILLS, D. 1985. Transposon mutagenesis and its potential for studying virulence genes in plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 23: 297 - 320.
- MINSAVAGE, G. V., DAHLBECK, D., WHALEN, M. C., KEARNEY, B., BONAS, U., STASKAWICZ, B.J. & STALL, R. E. 1990. Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* - pepper interactions. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 3: 41 - 47.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, S. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473 - 497.
- MURATA, H., McEVOY, J. L., CHATERJEE, A., COLLMER, A. & CHATERJEE, A. K. 1991. Molecular cloning of an *sepA* gene that activates production of extracellular pectolytic, cellulolytic, and proteolytic enzymes in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 4: 239 - 246.

- NIEPOLD, F., ANDERSON, D. & MILLS, D. 1985. Cloning determinants of pathogenesis from *Pseudomonas syringae* pathovar *syringae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 406 - 410.
- OSBOURN, A. E., BARBER, C. E. & DANIELS, M. J. 1987. Identification of plant-induced genes of the bacterial pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* using a promoter-probe plasmid. *EMBO J.* 6: 23 - 28.
- PATIL, S. S., HAYWARD, A. C. & EMMONS, R. 1974. An ultraviolet induced non-toxinogenic mutant of *Pseudomonas phaseolicola* of altered pathogenicity. *Phytopathol.* 64: 590 - 595.
- REIFSCHNEIDER, G. J. B., BONGIOLO, N. A. & TAKATSU, A. 1985. Reappraisal of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strains - Their terminology and distribution. *Fitopatol. Bras.* 10: 201 - 204.
- REIMERS, P. J. & LEACH, J. E. 1991. Race-specific resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* conferred by bacterial blight resistance gene *Xa-10* in rice (*Oryza sativa*) involves accumulation of a lignin-like substance in host tissues. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 38: 39 - 55.

- RIED, J. L. & COLLMER, A. 1988. Construction and characterization of an *Erwinia chrysanthemi* mutant with directed deletions in all of the pectate lyase structural genes. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 1: 32 - 38.
- ROBBS, C. F. 1985. Tomate: doenças causadas por bactérias. *Inf. Agropec.* 11: 45 - 50.
- ROBERTS, D. P. , DENNY, T. P. & SCHELL, M. A. 1988. Cloning of the *egl* gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in pathogenicity. *J. Bacteriol.* 170: 1445 - 1451.
- ROMEIRO, R. S. 1985. Bactérias como fitopatógenos. *Inf. Agropec.* 11: 16 - 20.
- RONALD , P. & STASKAWICZ, B. 1988. The avirulence gene *avrBs1* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* encodes a 50-kD protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5: 191 - 198.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning : a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., USA.

- SAWCZYK, M. K., BARBER, C. E. & DANIELS, M. J. 1989.
The role of some related genes in *Xanthomonas campestris* pathovars *campestris* and *translucens*: a shuttle strategy for cloning genes required for pathogenicity. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 2: 249 - 255.
- SHELL, M. A., ROBERTS, D. P. & DENNY, T. P. 1988.
Analysis of the *Pseudomonas solanacearum* polygalacturonase encoded by *pglA* and its involvement in pathogenicity. *J. Bacteriol.* 170: 4501 - 4508.
- SEAL, S. E., COOPER, R. M. & CLARKSON, J. M. 1990.
Identification of a pathogenicity locus in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Gen. Genet.* 222: 452 - 456.
- SHAW, J. J., SETTLES, L. G. & KADO, C. I. 1988.
Transposon Tn4431 mutagenesis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: characterization of a nonpathogenic mutant and cloning of a locus for pathogenicity. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 1: 39 - 45.

SCHULTE, , R. & BONAS, U. 1992. Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *hrp* gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. *J. Bacteriol.* 174: 815 - 823.

SIERRA, G. 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek Ned. Tij. Dschr. Hyg.* 23: 15 - 22.

SMITH, E. F. 1895. *Bacillus tracheiphilus* sp. nov., die Ursache die Verwelkens verschiedener Cucurbitaceen. *Zentralbl. Bakteriol., Parasitenkol., Infektionskr. Hyg., Abt. 2, Naturwiss.:Allg., Landwirtsch. Tech. Mikrobiol.* 1: 364 - 373.

SMITH, E. F. & TOWNSEND, C. O. 1907. A plant tumor of bacterial origin. *Science* 25: 671 - 673.

SOW , P. & DEMAIN, A. L. 1979. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRLL B - 1459. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 1186 - 1192.

- STALL, R. E., LOSCHKE, D. C. & JONES, J. B. 1986. Linkage of copper resistance and avirulence loci on a self-transmissible plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathol.* 76: 240 - 243.
- SWANSON, J. , KEARNEY, B., DAHLBECK, D. & STASKAWICZ, B. 1988. Cloned avirulence gene of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* complements spontaneous race-change mutants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1: 5-9.
- SWARUP, S., DE FEYTER, R., BRLANSKY, R. H. & GABRIEL, D. W. 1991. A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit cancerlike lesions in citrus. *Phytopathol.* 81: 802 - 809.
- TURNER , P. , BARBER, C. & DANIELS, M. 1984. Behaviour of the transposons Tn5 e Tn7 in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol. Gen. Genet.* 195: 101 - 107.
- TURNER, P., BARBER, C. & DANIELS, M. 1985. Evidence for clustered pathogenicity genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol. Gen. Genet.* 199: 338 -343.

- TANG, J. L., GOUGH, C., BARBER, C. E. , DOW , J. M. & DANIELS, M. J. 1987. Molecular cloning of a protease gene(s) from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: expression in *Escherichia coli* and role in pathogenicity.
- VAUTERIN, L. , SWINGS, J. , KERSTERS, K., GILLIS, K., MEW, T. M. ,SCHROTH, M. N. , PALLERONI, N. J. , HILDEBRAND, D. C., STEAD , D. E., CIVEROLO, E. L. HAYARD, A. C., MARAITE, H., STALL, R. E., VIDAVER, A. K. & BRADBURY, J. F. 1990. Towards an improved taxonomy of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 312 - 316.
- WANEY, V. R., KINGSLEY, M. T. & GABRIEL, D. W. 1991. *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* genes determining host-specific virulence and general virulence on cereals identified by Tn5- *gusA* insertion mutagenesis. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 4: 623 - 627.
- WEI, Z., SNEATHM B. J. & BEER, S. V. 1992. Expression of *Erwinia amylovora* *hrp* genes in response to environmental stimuli. *J. Bacteriol.* 174: 1875 - 1882.

- WHITE, T. J. & GONZALEZ, C. F. 1991. Application of electroporation for efficient transformation of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. *Phytopathol.* 81: 521 - 524.
- WILLIS, D. K., RICH, J. J. & HRABAK, E. M. 1991. *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 4: 132 - 138.
- XIAO, Y., LU, Y., HEU, S. & HUTCHENSON, S. W. 1992. Organization and environmental regulation of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 *hrp* gene. *J. Bacteriol.* 174: 1734 - 1741.