

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

RESISTÊNCIA AO COBRE E PERFIL DE RESTRIÇÃO DE ADN
PLASMIDIAL DE *Xanthomonas campestris* pv. *citri*

João Leodato Nunes Maciel
Engenheiro Agrônomo (UPF)

Dissertação apresentada como um dos
requisitos à obtenção do Grau de
Mestre em Fitotecnia

Porto Alegre (RS), Brasil
Setembro, 1994

Instituto de Ciências
Tecnologia de Alimentos
Biblioteca

CIP - CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

M152r Maciel, João Leodato Nunes
Resistência ao cobre e perfil
de restrição de ADN plasmidial
de Xanthomonas campestris pv. ci-
tri / João Leodato Nunes Maciel.
- Porto Alegre : UFRGS, 1994.
x, 69 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Uni-
versidade Federal do Rio Grande
do Sul. Programa de Pós-Graduação
em Agronomia - Fitotecnia, Porto
Alegre, 1994.

1. Podridão negra : Análise
química : Meio cultura : Cobre. I.
Título.

CDD: 634.3044

CDU: 634.3-235(043.3)

Catálogo na publicação: Biblio-
teca Setorial da Faculdade de
Agronomia da UFRGS.

JOÃO LEODATO NUNES MACIEL
Eng° Agr° (UPF)

DISSERTAÇÃO

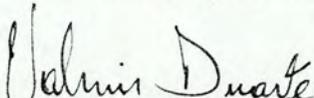
Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

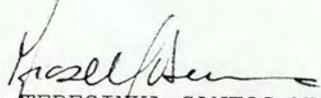
MESTRE EM FITOTECNIA

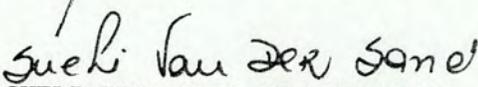
Programa de Pós-Graduação Em Agronomia
Faculdade de Agronomia

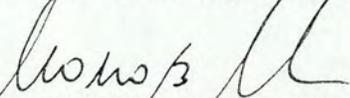
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 02.09.1994.
Pela Banca Examinadora


VALMIR DUARTE
Orientador


AIDA TERESINHA SANTOS MATSUMURA

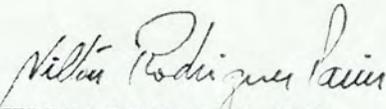

SUELI TERESINHA VAN DER SAND


MARCO ANTONIO ZACHIA AYUB


JOSÉ MAURÍCIO CUNHA FERNANDES
CNPT/EMBRAPA - Passo Fundo

Homologado em: 14.11.1994
Por


HOMERO BERGAMASCHI
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Agronomia


NILTON RODRIGUES PAIM
Diretor da Faculdade de
Agronomia

AGRADECIMENTOS

- Aos professores Valmir Duarte e Marco Antônio Zachia Ayub, pela orientação e amizade durante a realização deste trabalho
- _ Ao professor João A. Pêgas Henriques, pela disponibilidade de equipamentos e laboratórios
- _ Ao GENOTOX do Centro de Biotecnologia, pelo oferecimento de materiais e reagentes
- _ Aos colegas dos Laboratórios 219 e 217 do Centro de Biotecnologia, pela colaboração e companheirismo
- _ Aos professores, alunos e funcionários do Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia (UFRGS), pelos esclarecimentos e apoio
- _ Ao CNPq, pela concessão de bolsa de estudos
- _ Ao professor Aino V. A. Jacques, pela confiança e encorajamento
- Ao meu sogro e a minha sogra pelo incentivo
- _ A minha família e, em especial, a minha mãe, Eroni T. Almeida Maciel, e ao meu pai, Melkisedeck Ortiz Maciel, pela herança da valorização do trabalho, perseverança e integridade
- _ A minha esposa, Liane, pelo incentivo, afeto, paciência e compreensão no decorrer do curso

RESISTÊNCIA AO COBRE E PERFIL DE RESTRIÇÃO DE ADN
PLASMIDIAL DE *Xanthomonas campestris* pv. *citri*^{1/}

Autor: João Leodato Nunes Maciel
Orientador: Valmir Duarte
Co-orientador: Marco Antônio Zachia Ayub

SINOPSE

Vinte e um isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (*Xcc*), provenientes de cinco municípios do RS, foram cultivados em meio de cultura CYE (casitone, 1; extrato de levedura, 0,35; glicerol, 2; ágar, 15 g/l), com zero, 16, 32, 40, 48, 64, 80, 96, 112 e 128x10⁻² mM de CuSO₄. A concentração mínima inibitória (CMI) de CuSO₄ foi de 40x10⁻² mM para todos os isolados. O clone pCuR2.A de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, associado com resistência ao cobre, foi utilizado como sonda para detecção de homologia com o ADN total de *Xcc*. Não houve hibridização com o ADN total de nenhum dos 21 isolados. Quando o ADN plasmidial de 16 isolados foi digerido com as enzimas de restrição *Hind*III e *Bam*HI, fragmentos, variando de 9 a 10 kb e 4 a 5 kb, respectivamente, foram detectados com maior frequência. Os plasmídeos apresentaram grande polimorfismo, porém a análise de grupos hierárquicos indicou a formação de pelo menos três grupos distintos. O uso de perfis de restrição para identificação de *Xcc* dependerá da escolha de perfis realmente representativos de cada grupo para viabilizar comparações. A relação entre a virulência de *Xcc* com o perfil de restrição plasmidial não foi confirmada.

^{1/} Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, área de concentração Fitossanidade - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. (69p.) Agosto, 1994.

COPPER RESISTANCE AND RESTRICTION PROFILE OF PLASMID
DNA OF *Xanthomonas campestris* pv. *citri*^{1/}

Author: João Leodato Nunes Maciel
Adviser: Valmir Duarte
Co-adviser: Marco Antônio Zachia Ayub

ABSTRACT

Twenty one isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (*Xcc*), from five counties of RS, were grown on CYE (casitone, 1; yeast extract, 0.35; glycerol, 2; agar 15 g per liter) culture amended with zero, 16, 32, 40, 48, 64, 80, 96, 112 and 128×10^{-2} mM CuSO_4 . The CuSO_4 minimum inhibitory concentration (CMI) was 40×10^{-2} mM to all isolates. The pCuR2.A clone of *X. campestris* pv. *vesicatoria*, associated with copper resistance, was used as a probe to detect homology with total DNA of *Xcc*. No hybridization with DNA of the 21 isolates was found. When hybridization with total DNA of 16 isolates was digested with *Hind* III and *Bam* H I restriction enzymes, fragments, ranging from 9 to 10 kb and 4 to 5 kb, respectively, were detected more frequently. There was great polymorphism among plasmids, and the analysis of hierarquical groups showed at least three distinct groups. The use of DNA restriction profile to identify *Xcc* depends on a representative profile of each group to allow comparinsons. The relationship between virulence of *Xcc* and the plasmid DNA restriction profile was not confirmed.

^{1/} M. Sc. Dissertation in Crop Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (69p.) September, 1994.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Ocorrência do cancro cítrico	3
2.2. Controle do cancro cítrico	3
2.3. Ação do cobre sobre a fisiologia de bactérias	6
2.3.1. Origem da resistência ao cobre.....	7
2.3.2. Avaliação da resistência ao cobre....	8
2.4. Monitoramento do meio ambiente	9
2.5. Resistência ao cobre em <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	10
2.6. Formas do cancro cítrico	11
2.6.1. Reclassificação de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i>	12
2.6.2. Identificação de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i>	13
2.7. Plasmídeos	14
2.8. Utilização do ADN na identificação de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i>	16
2.9. Isolamento de ADN plasmidial de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i>	17
2.10. Perfis dos plasmídeos de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i>	18
2.11. Titulação da virulência	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1. Isolados	21
3.2. Resistência ao cobre	22
3.3. Isolamento do ADN plasmidial	23
3.3.1. Digestão com enzimas de restrição ...	24
3.3.2. Eletroforese em gel de agarose	25
3.3.3. Análise de grupos hierárquicos	25
3.4. Homologia com a sonda pCuR2.A	26
3.4.1. Digestão do plasmídeo pUC119	27
3.4.2. Recuperação do fragmento pCuR2.A	27

	Página
3.4.3. Isolamento do ADN total de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. citri	28
3.4.4. "Southern blot"	29
3.4.5. Sonda do fragmento pCuR2.A para hibridização	30
3.4.6. Teste de incorporação	30
3.4.7. Pré-hibridização	31
3.4.8. Hibridização	31
3.4.9. Lavagem	32
3.4.10. Autoradiografia	32
3.5. Titulação da Virulência	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1. Isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. citri	34
4.2. Testes no meio CYE	36
4.2.1. Sensibilidade ao cobre	37
4.2.2. Relação entre os testes "in vitro" e "in vivo"	38
4.3. Isolamento do ADN plasmidial	39
4.3.1. Características do ADN plasmidial ...	40
4.3.2. Fragmentos comuns	43
4.3.3. Avaliação do perfil de restrição	44
4.4. Homologia com a sonda pCuR2.A	51
4.5. Titulação da virulência	53
5. CONCLUSÕES	59
6. BIBLIOGRAFIA CITADA	60
7. APÊNDICES	66

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Municípios de origem dos isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. citri e experimentos a que foram submetidos no presente trabalho	35
2. Outras bactérias utilizadas no presente trabalho.	36
3. Perfil de restrição plasmidial de isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv.citri	45
3. Porcentagem de similaridade entre isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. citri baseado no perfil de restrição do ADN plasmidial digerido com BamHI e HindIII	47
4. Equações lineares e inclinações das retas da relação entre a concentração de células de isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. citri e a reação de folhas de pomeleiro (<i>Citrus paradisi</i> Macf.)	54

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Perfil de restrição plasmidial dos isolados (2) URCs 102, (3) SMMCs 113, (4) SACs 112 e (5) BUCs 106 de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. citri, digerido com BamHI. O número 1 refere-se ao fago lambda digerido com HindIII.....	41
2. Perfil de restrição plasmidial dos isolados (1) SSCs 131, (2) SMMCs 121 e (3) SACs 117 de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. citri, quando digerido com BamHI. O número 4 refere-se ao fago lambda digerido com HindIII	42
3. Histograma da distribuição do coeficiente de similaridade do perfil de restrição plasmidial entre isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. citri.	48
4. Fenograma de similaridade da relação entre os isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. citri, utilizando o método de ligação completa	49
5. ADN total dos isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. citri digeridos com HindIII (A). "Southern blot" do ADN total dos isolados de X.c. pv. citri com a sonda pCuR2.A (B). Os números representam os isolados (1) URCs 101, (2) URCs 103, (3) URCs 104, (4) BUCs 107, (5) SACs 108, (6) SACs 109, (7) SACs 110, (8) SACs 111, (9) SMMCs 113, (10) SSCs 131, (11) 106R.A, (12) 106R.B. O número 13 é a sonda pCur2.A e o 14 é o fago lambda digerido com BamHI e HindIII	52
6. Análise de correlação linear entre a similaridade plasmidial com o isolado SACs 110 e a virulência de 15 isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. citri	57

7. Análise de correlação linear entre a similaridade plasmidial com o isolado SACs 126 e a virulência de 15 isolados de *Xanthomonas campestris* pv. citri 58

1. INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa uma posição destacada no cenário citrícola internacional. Além disso, as frutas cítricas constituem-se em fonte acessível de energia e vitamina C para grande parte da população brasileira. Entretanto, a produção de citros pode ser limitada por uma série de moléstias destacando-se como uma das mais importantes, o cancro cítrico (CC), causado por *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye (*Xcc*).

O controle do CC foi obtido em países como EUA e Nova Zelândia através da erradicação de plantas com a moléstia. O custo da adoção de programas de erradicação torna questionável esta prática.

O tratamento de plantas cítricas com produtos à base de cobre, conhecidos como cúpricos, tem sido preconizado como uma das medidas preventivas no controle do CC. O sucesso de tal medida depende da sensibilidade de *Xcc* ao cobre e da ausência de indivíduos resistentes a este bactericida. Assim sendo, primeiramente testou-se a sensibilidade dos isolados de *Xcc* ao cobre em meio de cultura. A seguir, considerando os relatos na literatura documentando a presença de genes de resistência ao cobre em plasmídeos, realizou-se testes de

hibridização com o ADN total de isolados de *Xcc* do Estado do Rio Grande do Sul utilizando como sonda um fragmento plasmidial oriundo de estirpe resistente ao cobre de *X. c. pv. vesicatoria*.

Plasmídeos têm sido mencionados em vários trabalhos como sendo úteis para diferenciar estirpes bacterianas em comparações entre espécies ou patovares. Aos plasmídeos também tem-se atribuído várias funções fenotípicas sem, no entanto, obter comprovações a esse respeito, principalmente em bactérias da espécie *X. campestris*. Assim, a partir de diversos isolados de *Xcc* e utilizando técnicas de isolamento, obteve-se plasmídeos, os quais foram digeridos com enzimas de restrição e submetidos à ação de eletroforese. O perfil de restrição obtido foi correlacionado com a titulação da virulência dos isolados de *Xcc*.

Baseado nas afirmações anteriores, este trabalho teve por objetivos verificar: 1) a sensibilidade de *Xcc* ao cobre, 2) a homologia do ADN de *Xcc* com genes promotores de resistência ao cobre, 3) a adequação do uso de perfis de restrição plasmidial na identificação de *Xcc*, 4) a titulação da virulência de *Xcc*, 5) a correlação entre virulência e perfil de restrição plasmidial.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Ocorrência do cancro cítrico

A moléstia conhecida como cancro cítrico (CC), a qual ocorre em muitas regiões do mundo, é causada por *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye (Xcc) em plantas de *Citrus* sp. (HARTUNG, 1992). Os sintomas típicos incluem manchas necróticas nas folhas, frutos e ramos, sendo que em infecções severas podem causar desfolhamento e queda prematura dos frutos (STALL & SEYMOUR, 1983).

No Brasil, o primeiro registro do aparecimento da moléstia foi em março de 1957, em São Paulo, Estado que se destacou no combate ao CC através de campanhas de erradicação (SANTOS, 1991). Hoje, esta moléstia ocorre em vários Estados do Brasil como Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e São Paulo.

2.2. Controle do cancro cítrico

FAWCETT, citado por STALL & SEYMOUR (1983), acredita que o CC teve sua origem no sudeste da Ásia, sendo disseminado para o Japão e daí para os EUA. Depois da

introdução nos EUA, em 1910, a moléstia foi caracterizada e reconhecida como única devido a sua grande severidade, favorecida pelas condições favoráveis de umidade e temperatura (BERGER, citado por STALL & SEYMOUR, 1983). Do Japão do século passado não se tem registro da adoção de medidas de controle específicas para o CC, mas nos EUA, logo após o reconhecimento da moléstia, deu-se ênfase para a erradicação que como forma de controle atingiu seus objetivos pelo menos em determinadas épocas ou momentos, não só nos EUA mas também em outros países como África do Sul, Austrália e Nova Zelândia (STALL & SEYMOUR, 1983). Em países como Brasil, Argentina e o próprio Japão, foram feitas tentativas de erradicação do CC, com maior ou menor nível de êxito mas sem conseguir seus objetivos finais. No Japão, medidas alternativas à erradicação atingiram um nível satisfatório de controle do CC, adotando-se o quebra-ventos ao redor dos pomares, poda e recolhimento dos ramos com a moléstia, seis a oito pulverizações com cúpricos para proteger a brotação, desinfestação de equipamentos e ferramentas, e plantio de variedades mais resistentes como a variedade de laranjeira Unshiu (KUHARA, 1978; citado por STALL & SEYMOUR, 1983).

Uso de cúpricos no controle do cancro cítrico. Muitos trabalhos já foram realizados visando avaliar a real capacidade dos cúpricos no sentido de controlar o CC concluindo-se que a eficiência desses produtos tem apenas a magnitude preventiva. STALL (1980) demonstrou que a efetividade dos cúpricos para diminuir a incidência do CC

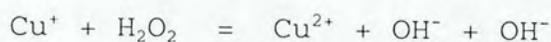
depende da época da aplicação. Para folhas, visando protegê-las, STALL (1980) sugere que a aplicação dos cúpricos seja feita quando alcançarem 75-90% de sua expansão total, fato que normalmente ocorre pouco antes da primavera, garantindo, dessa forma, o desenvolvimento foliar. Para proteger os frutos, o mesmo autor recomenda que a aplicação dos cúpricos seja feita quando medirem 5 a 7 cm de diâmetro, dependendo da espécie. TIMMER (1988) adverte, porém, que se deva evitar a aplicação de cúpricos durante o pico da floração pois, ao contrário, pode ocorrer o favorecimento da moléstia conhecida como "Queda dos Frutos Pós-Florescimento", causada por *Colletotrichum gloesporioides*. STALL et al. (1980) afirmam que os cúpricos não são altamente eficientes mas são os únicos produtos que dão alguma proteção a *Citrus* sp. contra o CC.

No Brasil, o tratamento com cúpricos tem sido proposto como um componente das medidas de controle do CC (LEITE Jr., 1987) porém, se desconhece totalmente a sensibilidade de Xcc ao cobre. No momento, a situação do Rio Grande do Sul se caracteriza pela influência de regiões próximas, onde sabidamente persiste a convivência com o CC, como é o caso do Paraná, Santa Catarina, Uruguai e Argentina, tornando-se questionável a adoção de programas de erradicação.

2.3. Ação do cobre sobre a fisiologia de bactérias

Mecanismos especiais desenvolvidos por determinados microrganismos como a imobilização física, eliminação, aproveitamento e destoxificação promovem a resistência a metais pesados (SUMMERS & SILVER, citado por JAIN, 1990). Existe uma quantidade limitada de informações disponíveis sobre os mecanismos de resistência ao cobre (BENDER et al., 1990). LUTKENHAUS, citado por JAIN (1990), demonstrou que alguns isolados de *Escherichia coli* podem eliminar o cobre pela ausência de membranas proteicas envolvidas no seu transporte. Ácidos orgânicos e agentes quelantes produzidos por estirpes de *Krebsiela aerogenes* formam uma cápsula protetora capaz de promover uma tolerância de 10 ppm acima do nível tolerado pelas estirpes consideradas sensíveis (BITTON & FREIHOFER, citado por JAIN, 1990). A imobilização física de cobre pelo periplasma e outras membranas proteicas tem sido demonstrada como o mecanismo de resistência de *Pseudomonas syringae* (COOKSEY, 1990). Os mecanismos de resistência ao cobre em *X.c. pv. vesicatoria* ainda são desconhecidos. Mesmo as estirpes bacterianas consideradas sensíveis ao cobre, desconsiderando-se até o meio de cultura em que são feitos os testes "in vitro", apresentam alguma tolerância a esse elemento químico, porém com a concentração mínima inibitória (CMI) de CuSO_4 geralmente não ultrapassando a 0,8 mM. Essa tolerância é atribuída como taxa de mutação espontânea (BENDER et al., 1990).

Os íons de cobre apresentam funções fisiológicas benéficas para determinadas bactérias, podendo atuar na síntese de determinadas metaloproteínas ou em atividade de doação ou recepção na cadeia de elétrons (HUGHES, citado por BROWN et al., 1992). A toxidez do cobre é assegurada, por exemplo, pela sua atividade catalítica em reações redox, como a geração de radicais hidroxis na seguinte reação;



Os radicais hidroxis são altamente reativos e podem participar de inúmeras reações danosas como a peroxidação de lipídios (BROWN et al., 1992).

2.3.1. Origem da resistência ao cobre

O controle da moléstia causada por *X. c. pv. vesicatoria*, no pimentão, na Flórida, vinha sendo feito pela aplicação constante de cúpricos durante 40 anos até surgir o aparecimento de estirpes resistentes (STALL et al., 1986). O cancro bacteriano, causado por *P. syringae pv. syringae*, na cerejeira doce (*Prunus avium* L.) e na cerejeira amarga (*P. cerasus* L.) também apresentava um histórico de vários anos de aplicações semanais de cúpricos até o surgimento de estirpes resistentes (SUNDIN et al., 1989).

2.3.2. Avaliação da resistência ao cobre

O meio de cultura CYE, composto por casitone, extrato de levedura, glicerol e ágar (CYE) tem sido utilizado em testes para avaliação da resistência de bactérias ao cobre, sob a forma de sulfato de cobre (CuSO_4). O meio CYE é um substrato adequado nas investigações sobre a sensibilidade de bactérias ao cobre, em função da homogeneidade na concentração desses íons durante o crescimento bacteriano e pela baixa concentração de nutrientes capazes de reagirem com esses mesmos íons e torná-los indisponíveis quimicamente (ZEVENHUIZEN et al., 1979).

MENKISSOGLU & LINDOW (1991b), ao demonstrarem a exata concentração de íons de cobre livres no meio CYE, quando se adiciona CuSO_4 , determinaram que esta relação não é proporcional, mas sim quase que exponencial (Apêndice 1). Os resultados obtidos permitem avaliar qual a real concentração de cobre capaz de causar toxidez a qualquer microrganismo que venha a ter a sua sensibilidade testada. MENKISSOGLU & LINDOW (1991a) também conseguiram fazer um monitoramento da concentração e do estado iônico do cobre sobre as folhas de laranjeira doce (*C. sinensis* (L.) Osbeck), quando da aplicação de cúpricos. Quando foi realizado a pulverização de CuSO_4 , sob a forma de calda bordalesa ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 9,6 g/l; 22 l/árvore), observou-se que a concentração máxima de íons de cobre na superfície das folhas, obtida cerca de 60 dias após o tratamento, era em torno de 1 ppb ou $\text{pCu} = 7,8$, sendo que

pCu é o logaritmo negativo da concentração molar de íons de cobre (Apêndice 2). Os resultados obtidos nos dois últimos trabalhos torna possível de se fazer comparações entre a sensibilidade de bactérias ao cobre diante de testes "in vitro" e "in vivo".

2.4. Monitoramento do meio ambiente

Bactérias resistentes ao cobre têm sido isoladas de ambientes onde o nível desse elemento químico é elevado, tais como em atividades agrícolas, industriais ou de mineração (COOKSEY, 1993). O aparecimento de resistência ao cobre por parte de microrganismos fitopatogênicos, que eram controlados com o uso de cúpricos, é prejudicial dentro do contexto agrícola, pois implica na adoção de medidas alternativas de controle. Microrganismos com resistência ao cobre também podem ser úteis em atividades como a mineração, lixiviação e recuperação do cobre (JAIN, 1990).

YATES et al., citado por JAIN (1990), e GARDE & BENDER (1991) demonstraram a aplicação de técnicas de "Southern blot" e/ou "Dot blot", utilizando uma sequência clonada de genes envolvidos com resistência ao cobre (Cu^R) como sonda, para identificar sequências homólogas entre o ácido deoxiribonucleico (ADN) total de vários microrganismos. Técnicas de "Southern blot" ou "Dot blot" são procedimentos de fixação de ADN em membranas de nitrocelulose ou nylon, a partir de géis de agarose (SOUTHERN, 1975). O ADN fixado nas

membranas pode, então, ser submetido a testes de hibridização, visando determinar o nível de homologia com sondas marcadas. O processo de marcação das sondas é denominado de "Nick translation" e é um procedimento específico de incorporação de nucleotídeos marcados radioativamente, ou por outro processo, em ADN de fita dupla (MEINKOTH & WAHL, 1987).

2.5. Resistência ao cobre em *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria

Pulverizações com cúpricos têm sido recomendadas para o controle da mancha bacteriana do pimentão (*Capsicum annum* L.) e do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), causada por *X. c. pv. vesicatoria* desde que a moléstia foi descrita pela primeira vez, nos EUA, em 1922 (HIGGINS, citado por STALL et al., 1986). MARCO & STALL (1983) fizeram o primeiro registro de ocorrência de resistência ao cobre do fitopatógeno, em 1983, na Flórida. Resistência ao cobre foi constatada em estirpes de *X. c. pv. vesicatoria* oriundas da Flórida (CANTEROS et al., citado por COOKSEY, 1990), em Oklahoma (BENDER et al., 1990) e na Georgia (GITAITIS et al., 1985). Todas as estirpes resistentes ao cobre apresentam um grande plasmídeo com homologia ao plasmídeo pXvCu, identificado pela primeira vez nas estirpes resistentes ao cobre por STALL et al. (1986), na Flórida (COOKSEY, 1990). BENDER et al. (1990) demonstraram que os genes Cu^R estavam

localizados em um grande plasmídeo de *X. c. pv. vesicatoria*, designado de pXV10A. Os genes Cu^R foram isolados em um clone de 44 kb, denominado pCuR1 (Apêndice 3) por GARDE & BENDER (1991), a partir do pXV10A. Subclones de pCuR1 foram utilizados por GARDE & BENDER (1991) como sonda em sistemas de "Southern blot" e "dot blot" para verificação de possível homologia com o ADN total de várias espécies e patovares de bactérias.

2.6. Formas do cancro cítrico

Até 1984, quatro formas de CC eram descritas, primariamente distingüidas pela sua origem e hospedeiros preferenciais. O aparecimento de uma quinta forma de CC, em plantas de viveiro da Flórida, denominada E, causou enorme consternação e preocupação, aumentando os esforços para erradicação da moléstia nos EUA (SCHOULTIES et al., 1987).

As estirpes classificadas como A são nativas da Ásia e são mais agressivas ao pomeleiro (*Citrus paradisi* Macf.), à limeira mexicana (*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle), à laranjeira doce e ao limoeiro (*C. limon* (L.) Burm.); as estirpes classificadas como B ocorrem principalmente na Argentina, Paraguai e Uruguai e são mais agressivas ao limoeiro e a limeira mexicana; as estirpes classificadas como C são encontradas no Brasil e afetam somente a limeira mexicana; e as estirpes classificadas como D são restritas ao México e a América do Sul e se manifestam principalmente no

limoeiro e na limeira (HARTUNG, 1992).

A forma E pode ser considerada de maneira particularizada, uma vez que provoca um quadro sintomatológico diferencial conhecido como mancha bacteriana ou cancro dos viveiros da Flórida sendo predominantemente associada com o pomeleiro variedade Swingle (*C. paradisi* x *Poncirus trifoliata*) (GABRIEL et al., 1989).

2.6.1. Reclassificação de *Xanthomonas campestris* pv. citri

A utilização de uma nova classificação para Xcc foi sugerida por GABRIEL et al. (1989) baseada na similaridade entre o ADN total de estirpes representantes das cinco formas de CC. A similaridade entre estirpes foi determinada por testes de "restriction fragment length polymorphisms" (RFLP), o qual é baseado em sistemas de hibridização por sonda radioativa utilizando o ADN total dos indivíduos a serem comparados. Segundo a sugestão de GABRIEL et al. (1989), as estirpes pertencentes à forma A deveriam assumir a condição de espécie, chamando-se *X. citri* retomando a terminologia utilizada por DOWSON veiculada em 1939 (DYE et al., 1974); as estirpes B, C e D seriam classificadas como *X. campestris* pv. *aurantifolii*; e as estirpes da forma E seriam denominadas *X. campestris* pv. *citrumelo*.

YOUNG et al. (1991) contesta, afirmando que os

métodos recomendados pelo Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias, baseado em cerca de 60 diferentes testes bioquímicos, são suficientes para classificar e distinguir qualquer entidade bacteriana. YOUNG et al. (1991) também mencionam a natureza fragmentaria dos estudos de RFLP e a diversidade de procedimentos sendo que as possíveis interpretações decorrentes podem limitar a utilização do ADN como elemento de classificação. KRAWIEC (1985) também afirma que o uso de fragmentos de ADN como sondas em sistemas de RFLP pode desconsiderar muitos elementos do genoma que seriam taxonomicamente importantes.

2.6.2. Identificação de *Xanthomonas campestris* pv. citri

Diversas técnicas têm sido utilizadas para caracterizar e identificar as bactérias causadoras do CC, baseando-se em diferenças observadas em relação à patogenicidade (HAMLIN, 1967; NAMEKATA, citado por CIVEROLO, 1985; NAMEKATA & BALMER, citado por CIVEROLO, 1985), à fisiologia (GOTO et al., citado por CIVEROLO, 1985), à sensibilidade à bacteriófagos (GOTO et al., citado por CIVEROLO, 1985), à sorologia (BACH et al., 1982; BACH et al., citado por CIVEROLO, 1985; MESSINA, citado por CIVEROLO, 1985; CIVEROLO & FAN, 1982; ALVAREZ & BENEDICT, 1990; ALVAREZ et al., 1987), ao nível de homologia de ADN plasmidial (LIN et al., 1979; CIVEROLO 1985; GABRIEL, 1985; LAZO & GABRIEL,

1987; STRIPECKE & ROSATO, 1988; ULAGANATHAN & MAHADEVAN, 1990; HARTUNG, 1992; PRUVOST et al., 1992) e ADN total (HARTUNG & CIVEROLO, 1987; GABRIEL et al., 1988; HARTUNG & CIVEROLO, 1989; GABRIEL et al., 1989; EGEL et al., 1991; BROADBENT et al., 1992). A maioria desses trabalhos, expressos em diferentes magnitudes em função da técnica, objetivam classificar ou identificar estirpes pertencentes às diferentes formas do CC. Ao se testar várias técnicas para identificar Xcc intrinsicamente busca-se, também, justamente definir qual é a mais rápida, adequada e precisa, uma vez que a solicitação de diagnóstico de plantas para determinação do agente causal do CC é um procedimento rotineiro em regiões citrícolas.

2.7. Plasmídeos

Os plasmídeos assumem grande importância na perpetuação da vida bacteriana através da codificação de funções fenotípicas, da capacidade de garantirem variabilidade genética pela conjugação e, finalmente, pela possibilidade de envolverem-se diretamente em processos adaptativos como a resistência a metais, antibióticos, produção de bacteriocinas, síntese de enzimas, patogenicidade a animais ou plantas, etc... (SOUZA, 1987).

Os plasmídeos apresentam como principais características morfológicas diferenciais a sua configuração de ADN circular, as variações no peso molecular (0,7 - 500

megadaltons) e o número relativamente constante de plasmídeos por célula (1 a 3) na maioria das bactérias (COPLIN, 1982). Nos experimentos iniciais o ADN plasmidial era isolado somente na forma linear mas o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis possibilitou a separação de plasmídeos sob duas conformações: circular, covalentemente fechada, ou superenrolada (SOUZA, 1987).

Quando os plasmídeos são submetidos à ação de enzimas de restrição (endonucleases) estas promovem o que se chama de digestão ou clivagem proporcionando a fragmentação do ADN plasmidial. As enzimas de restrição têm a capacidade de reconhecerem sequências específicas de ADN e, exatamente ali, promoverem a clivagem onde, por exemplo, *Bam*HI e *Hind*III reconhecem as seguintes sequências de nucleotídeos: 5'-GGATCC-3' e 5'-AAGCTT-3', respectivamente (WINNACKER, 1987).

Ocorrência de plasmídeos em bactérias fitopatogênicas. Praticamente todas as espécies de bactérias fitopatogênicas têm sido examinadas no sentido de observar a presença de plasmídios. A grande maioria dos relatos descreve a presença de plasmídeos, no entanto, a maioria desses plasmídeos permanecem crípticos, isto é, sem nenhuma função conhecida (COPLIN, 1989). Seja como resultado final ou intrínscico, esses trabalhos revelam constatações biológicas importantes e de grande potencialidade no sentido da real utilização de plasmídeos como agente diferenciador de bactérias, seja entre espécies ou patovares diferentes, ou até mesmo em um único patovar. A diferenciação pode tanto

estar baseada no tamanho, número, perfil de restrição ou ocorrência de hibridização com sondas específicas de plasmídeos (STRIPECKE & ROSATO, 1988).

Salienta-se o trabalho realizado por LAZO & GABRIEL (1987) para verificar e caracterizar a presença de plasmídeos em diversos patovares da espécie *X. campestris*. No referido trabalho, incluindo mais de 125 patovares correntemente reconhecidos (DYE et al., 1980; BRADBURY, 1984), 26 diferentes patovares foram testados com o objetivo de determinar se o conteúdo plasmidial, baseados em sistemas de hibridização por sondas radioativas, poderia ser usado para diferenciar patovares de *X. campestris*. Os resultados permitiram concluir que o perfil de plasmídeos não-digeridos não são adequados para identificação, uma vez que várias estirpes, que apresentavam plasmídeos com dimensões muito próximas, demonstraram perfis muito diferentes depois da digestão com enzimas de restrição.

2.8. Utilização do ADN na identificação de *Xanthomonas campestris* pv. *citri*

Vários estudos já foram feitos no sentido de avaliar o conteúdo plasmidial (LIN et al., 1979; CIVEROLO 1985; GABRIEL, 1985; LAZO & GABRIEL, 1987; STRIPECKE & ROSATO, 1988; ULAGANATHAN & MAHADEVAN, 1990; HARTUNG, 1992; PRUVOST et al., 1992) e ADN total (HARTUNG & CIVEROLO, 1987; GABRIEL et al., 1988; HARTUNG & CIVEROLO, 1989; GABRIEL et al., 1989;

EGEL et al., 1991; BROADBENT et al., 1992) de *Xcc* com o objetivo básico de definir o nível de homogeneidade das bactérias pertencentes a esse patovar. Os trabalhos caracterizam-se por constituírem-se de estudos epidemiológicos através de comparações entre as diferentes formas de CC, embora veiculando, de forma paralela, a possibilidade de se estabelecer um procedimento padrão para identificação de *Xcc*.

PRUVOST et al. (1992) utilizaram os perfis de plasmídeos digeridos por enzimas de restrição separados em gel de agarose em sistema de eletroforese para diferenciar estirpes de *Xcc*. A comparação entre os perfis plasmidiais digeridos, como referido acima, também denomina-se técnica de "fingerprint" podendo ser executada com o auxílio de programas computacionais que determinam a similaridade entre indivíduos diferentes (SCOTT et al., 1993)

2.9. Isolamento de ADN plasmidial de *Xanthomonas campestris* pv. *citri*

A técnica para extração de plasmídeos de *Xcc* não parece de conhecimento geral uma vez que alguns pesquisadores não obtiveram sucesso nesse intento (LIN et al., 1979; ULAGANATHAN & MAHADEVAN, 1990). STRIPECKE & ROSATO (1988), que fizeram no Brasil a caracterização de plasmídeos de *Xcc*, não definiram com clareza os procedimentos e passos empregados.

O trabalho de CIVEROLO (1985) aponta para duas

dificuldades mais evidentes para isolar o ADN plasmidial de *Xcc*. A primeira dificuldade reside em eliminar o ADN cromossomal, sendo que os procedimentos para viabilizar o isolamento adequado do ADN plasmidial incluem, ou o aquecimento das amostras em processo de lise celular a 65°C, durante 2 h, ou à 93-96°C por 5 min, caracterizando a indefinição de um procedimento padrão. A segunda dificuldade é a estrutura natural da baixa definição de intensidade das bandas quando separadas em gel de agarose, acarretando possibilidades de imprecisão na caracterização do conteúdo plasmidial. Os motivos que promovem a baixa definição de intensidade das bandas, segundo o próprio CIVEROLO (1985), não foram conclusivamente determinadas, mas podem representar plasmídeos que estão presentes em baixo número de cópias, descaracterizando a possibilidade de promoverem algum tipo de função fenotípica. Alternativamente as bandas detectadas podem constituir arranjos de pequenos plasmídeos, ou ainda, a eficiência com que os plasmídeos são extraídos pelas preparações preconizadas pode ser baixa.

2.10. Perfis dos plasmídeos de *Xanthomonas campestris* pv. *citri*

Quanto aos perfis dos plasmídeos, CIVEROLO (1985); GABRIEL (1985); LAZO & GABRIEL (1987); PRUVOST et al. (1992) encontraram grande variação na magnitude de seus resultados quando se procedia a comparação entre estirpes de *Xcc*, seja

em termos de peso molecular, número de plasmídeos ou hibridização com sondas específicas. Essa variação foi constatada inclusive para estirpes pertencentes a mesma forma de CC, como foi demonstrado por PRUVOST et al. (1992) que encontrou em estirpes pertencentes à forma A, diferenças de 8 a 100 kb e 1 a 5, em relação ao peso molecular e ao número de plasmídeos, respectivamente. Ao contrário, STRIPECKE & ROSATO (1988) relataram a ocorrência de perfis de plasmídeos homogêneos com pouca ou nenhuma variação.

O perfil de plasmídeos, quando submetidos à ação de enzimas de restrição, também registra grande variação. PRUVOST et al. (1992) demonstraram, por exemplo, através de teste de "fingerprint" nos plasmídeos de *Xcc*, baseado nos perfis médios proporcionados pela ação das enzimas de restrição *Bam*HI, *Hind*III e *Eco*RI que os percentuais de similaridade entre estirpes pertencentes à forma A variou em torno de 25 a 95% .

2.11. Titulação da virulência

A virulência de um fitopatógeno pode ser avaliada através da relação proporcional entre a concentração do agente infeccioso e a freqüência da resposta específica do hospedeiro (MEYNELL & MEYNELL, citado por CIVEROLO, 1975). De acordo com ERCOLANI (1984), a titulação da virulência de bactérias é realizada em quatro etapas: 1.) uma suspensão bacteriana é diluída sucessivamente; 2.) cada diluição é

usada para inocular um grupo de plantas hospedeiras; 3.) a resposta de cada planta é registrada; e 4.) os dados são usados para estimar a virulência do patógeno ou a resistência do hospedeiro. As titulações de virulência podem ser baseadas tanto na resposta quantitativa como qualitativa. Resposta quantitativa é aquela na qual as plantas podem ser registradas como vivas ou mortas, doentes ou sádias, com ou sem lesão, etc... Resposta qualitativa pode ser caracterizada, por exemplo, como severidade ou tempo de incubação.

Equação de resposta. Segundo ERCOLANI (1984), em Fitobacteriologia, as titulações de virulência têm sido baseadas geralmente na resposta quantitativa. A proporção de plantas que respondem a uma determinada concentração do patógeno é registrada e uma equação da relação dose/resposta é obtida. A proporção de respostas positivas é convertida para probits. Probits significa a probabilidade de 50% das respostas serem positivas e é obtida através da tabela descrita por FINNEY (1971) (Apêndice 4).

A relação entre o probit da resposta e a concentração da suspensão bacteriana é a seguinte equação linear:

$$Y = aX + b$$

onde;

Y = Probit ou proporção de respostas positivas

X = Concentração da suspensão bacteriana

a = coeficiente de inclinação da reta (mensura a virulência)

b = ponto onde a reta passa pelo eixo y

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Isolados

Isolamento. Ramos, folhas e frutos de laranjeira (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) com lesões de cancro cítrico (CC) foram recebidos de diversos municípios do Rio Grande do Sul (Tabela 1). O isolamento de *Xanthomonas campestris* pv. citri (Hasse) Dye (Xcc) foi feito a partir de folhas que foram desinfestadas através da submersão por 30 s em álcool 70% e hipoclorito de sódio 1%, consecutivamente, e lavadas com água destilada esterilizada (ADE); tiras de tecido de 2-3 mm de largura da região do halo amarelado das lesões foram recortadas com um bisturi e maceradas em gotas de ADE em ambiente asséptico. Com uma alça de platina, transferiu-se algumas gotas (2-3) do macerado para a superfície do meio de cultura CCDEL (carbonato de cálcio, 20; extrato de levedura, 10; ágar, 20; dextrose, 20 g/l) em placas de petri semeando-se por esgotamento. Colônias amarelas, de tamanho uniforme, foram repicadas novamente para CCDEL.

Preservação. Os isolados (Tabela 1) foram mantidos de duas maneiras: (1) em microtubos (1,5 ml) com glicerol e caldo Wildbrink's (bactopeptona, 5; sacarose 2,5; K₂PO₄, 0,5;

MgSO₄, 0,25 g/l) (1:1), à -20°C; e (2) em tubos de ensaio com CCDEL, recoberto com óleo mineral, à 4°C.

Patogenicidade. Uma suspensão de células de cada isolado de Xcc foi feita em solução tampão fosfato 0,01 M. A concentração foi ajustada para aproximadamente 10⁷ unidades formadoras de colônias (UFC) por ml. A confirmação da real identidade das bactérias foi feita através da inoculação das folhas de laranjeira, recém perfuradas com alfinetes, com os isolados suspensos na solução tamponada.

Características. Todos os isolados foram submetidos ao crescimento em meio tetrazólio (extrato de carne, 3; peptona, 5; ágar, 15; sal de tetrazólio, 0,5 g/l) e HF de oxi-fermentação (peptona, 2; NaCl, 5; K₂HPO₄, 0,3; ágar, 3; azul de bromotimol, 0,08 g/l). Os isolados também foram submetidos ao teste de Gram.

3.2. Resistência ao cobre

A sensibilidade ao cobre dos 21 isolados foi testada em meio CYE (casitone, 1; extrato de levedura, 0,35; glicerol, 2; ágar 15 g/l). O sulfato de cobre (CuSO₄) foi adicionado ao meio, em diferentes quantidades (zero, 16, 32, 40, 48, 64, 80, 96, 112 e 128x10⁻² mM) e o pH ajustado para 6,0 antes da autoclavagem. A concentração mínima inibitória (CMI) de CuSO₄ necessária para impedir o crescimento Xcc foi determinado pela inoculação de 10 gotas do caldo Wildbrink's, o qual servira previamente de substrato para o crescimento

das bactérias, em placas de Petri com CYE+CuSO₄. O caldo Wildbrink's servia, então, de líquido de suspensão. com densidade ótica nunca inferior a 1,0 (600 nm). Esse tipo de suspensão era obtido pela ação de agitadores automáticos de meio líquido por 14 h, à 28°C. O experimento foi conduzido três vezes.

3.3. Isolamento do ADN plasmidial

O ácido deoxiribonucleico (ADN) plasmidial foi isolado conforme o método de KADO & LIU (1981) com algumas modificações sugeridas por PRUVOST et al. (1992). Após 24 - 48 h de crescimento, à 28°C, em meio LPA (extrato de levedura, 7; bactopectona, 7; ágar, 20 g/l; pH 7,2), colônias de Xcc foram transferidas para erlenmeyers contendo 50 ml de caldo Wildbrink's que foram mantidos em agitadores por 16 h, à 28°C. As células foram coletadas por centrifugação (Rotor Du Pont - SS 34, 10.000 rpm, 15 min, 4°C; centrífuga Du Pont). Os péletes foram suspensos em dois ml de solução tampão TE (10 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8,0). Adicionou-se, então, cinco ml de solução de lise (Dodecil Sulfato de Sódio 3%, SDS; 50 mM Tris; pH 12,6). As amostras foram incubadas por 15 min, à ± 25°C, e, então, por duas h à 65°C, condições estas sugeridas por PRUVOST et al. (1992) para degradar o ADN cromossomal. A seguir, foram feitas duas extrações com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (24:24:1), e uma com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), e as amostras foram, então, centrifugadas

como descrito acima. Um mililitro de acetato de sódio (3 M, pH 5,2) foi adicionado para cada cinco mililitros da fase aquosa contendo o ADN plasmidial. As amostras foram incubadas no gelo por 10 min e o ADN plasmidial foi precipitado pela adição de duas vezes o volume total (fase aquosa + acetato de sódio) de etanol absoluto gelado e novamente incubado por, no mínimo, 16 h, à -20°C. O ADN obtido depois da centrifugação foi lavado com etanol 70%. Peletes obtidos depois da centrifugação foram ressuspensos em 60 a 100 µl do tampão TAE (0,04 M Tris-HCl; 0,02 M Acetato de Sódio; 0,002 M EDTA ; pH 7,8) e estocados à -20°C.

3.3.1. Digestão com enzimas de restrição

As enzimas *Bam*HI e *Hind*III (Cenbiot) foram utilizadas na digestão do ADN plasmidial. A concentração, quantidade e ordem dos componentes da digestão foi a que segue; água, 4; tampão (Tris-HCl, 10 mmol/l; MgCl₂, 5 mmol/l; NaCl, 10 mmol/l), 1; ADN de *Xcc* (30-100 ng/µl), 5; enzima de restrição (10 un/µl), 1 µl.

A temperatura para digestão foi de 37°C por no mínimo duas h. Posteriormente adicionou-se dois µl de tampão de corrida (azul de bromofenol 0,25%; xilocianol 0,25%; sacarose 40%).

3.3.2. Eletroforese em gel de agarose

Os fragmentos de ADN foram separados em gel de agarose (agarose, 7; brometo de etídio, 2×10^{-7} g/l de tampão TBE, cuja composição é Tris-base, 10,8; ácido bórico, 5,5 g/l; 4 ml de EDTA 0,5 m, pH 8,0), a 6 V/cm, em cubas contendo também tampão TBE. A visualização foi feita com luz ultravioleta (300 nm). As fotografias foram tomadas usando filtro amarelo (Tiffen N° 12), filmes Polaroides (tipo 667). O tamanho dos fragmentos foram estimados através da análise de regressão linear do logaritmo da mobilidade relativa versus o logaritmo dos pares de bases (pb), usando o fago lambda digerido com a enzima de restrição *HindIII* como marcador de referência.

3.3.3. Análise de grupos hierárquicos

A restrição proporcionada pela ação das enzimas *BamHI* e *HindIII* foi utilizada na análise de grupos hierárquicos. O índice de similaridade entre os isolados foi determinado utilizando o programa computacional DNA-SIMDEX (SCOTT et al., 1993), o qual usa a seguinte equação para comparar isolados;

$$S_{xy} = \frac{2 n_{xy}}{n_x + n_y}$$

onde;

S_{xy} = é o índice de similaridade entre os isolados x e y

n_{xy} = o número de bandas em comum entre o isolado x e o
isolado y

n_x = número total de bandas do isolado x

n_y = número total de bandas do isolado y

A indicação de que determinadas bandas eram comuns foi feita tomando por base diferenças de no máximo 5 % . O coeficiente calculado foi obtido pela média das observações feitas quando da utilização das enzimas *Bam*HI e *Hind*III. Para fazer a análise de grupos hierárquicos utilizou-se o método de ligação completa do programa computacional SAS/STAT (SAS Institute, 1987).

3.4. Homologia com a sonda pCu2.A

Para a execução do teste de hibridização por sonda radioativa com a sonda específica pCu2.A, inicialmente realizou-se o isolamento do plasmídeo pUC119, contido na estirpe HB 101 de *Escherichia coli*, gentilmente cedida pela Dra. Carol L. Bender, da Universidade de Oklahoma, EUA, baseando-se em maxi-preparação recomendada por MANIATIS et al. (1982).

3.4.1. Digestão do plasmídeo pUC119

O isolamento do fragmento pCuR2.A foi feito através da digestão do plasmídeo pUC119 com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III, as quais foram utilizadas baseando-se no perfil de restrição demonstrado por GARDE & BENDER (1991) (Apêndice 3).

A quantidade, a concentração e a ordem dos componentes da digestão é a que segue; água, 8; tampão (Tris-HCl, 20 mmol/l; MgCl₂, 5 mmol/l; NaCl, 100 mmol/l), 4; ADN pCuR2.A (1800-2000 ng), 20; enzima *Bam*HI (10 un/μl), 4; enzima *Hind*III (10 un/μl), 4 μl.

Após 14 h, à 37°C, foi adicionado 6 μl de tampão de corrida.

3.4.2. Recuperação do fragmento pCuR2.A

O fragmento pCuR2.A foi identificado e separado através de eletroforese e recuperado a partir do gel de agarose baseando-se no método preconizado por TAUTZ & RENZ (1983) com algumas modificações.

Inicialmente, a banda observada foi recortada no gel de agarose (0,7%) e equilibrada por 30 min em solução 0,3 M acetato de sódio (pH 7,0), 1 mM EDTA, com volume de, no mínimo, 10 vezes superior ao pedaço do gel. A seguir, um microtubo com capacidade de 0,5 ml (Eppendorf), com o auxílio de uma fina agulha, teve seu fundo perfurado e revestido com

lã de vidro. O pedaço de gel foi colocado no microtubo perfurado, e este colocado num microtubo de maior capacidade (1,0 ml). O conjunto dos microtubos foi imerso em nitrogênio líquido durante 5 min e centrifugado (12.000 rpm/10min), proporcionando que o líquido do gel fosse depositado no fundo do microtubo maior. Para cada 100 μ l da fase aquosa foi adicionado um μ l de solução de cloreto de magnésio (1 M de $MgCl_2$; 10% de ácido acético) e 250 μ l de etanol 100%. Depois de precipitar por 14 h, à $-20^\circ C$, a amostra foi centrifugada (12.000 rpm/10 min), lavada com etanol 70%, centrifugada (10.000 rpm/10 min), deixada secar e ressuspensa em 30 μ l de tampão TR (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,1 mM EDTA).

3.4.3. Isolamento do ADN total de *Xanthomonas campestris* pv. *citri*

O ADN total de Xcc foi obtido como descrito anteriormente (3.3.), mas com mudanças nas condições de temperatura de ação da lise alcalina, alterando de $65^\circ C$ para as condições de temperatura ambiente ($25^\circ C$) e realizando apenas uma extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (24:24:1). O ADN total dos 21 isolados de Xcc foi digerido com a enzima de restrição *Hind*III e resolvido em gel de agarose (0,7%). O nível de homologia dos ADNs totais de dois isolados bacterianos contaminantes, 106R.A e 106R.B, sem classificação conhecida, e com alta resistência ao cobre (CMI de $CuSO_4$ igual a 112×10^{-2} mM), com o fragmento pCuR2.A foi

determinado através de hibridização por sonda radioativa. A extração do ADN total desses dois isolados foi realizada como descrito para extrair o ADN total de *Xcc* e depois digerido com *HindIII*.

3.4.4. "Southern blot"

Depois de fotografado, os géis foram lavados duas vezes (15 min cada uma) em solução desnaturante (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl), e duas vezes (30 min cada uma) em solução neutralizante (0,5 M Tris-HCl, pH 7,2; 1,5 M NaCl; 1 mM EDTA). Os géis estavam prontos, então, para serem transferidos para a membrana de nylon.

Uma membrana de nylon (Hybond, Amersham, UK), três lâminas de papel-filtro e aproximadamente cinco cm de papel-toalha foram recortados exatamente com as mesmas dimensões dos géis. A membrana foi umedecida com a solução neutralizante e uma pilha foi arranjada na seguinte ordem; placa de vidro N° 1; gel; membrana de nylon; camada de papel-filtro; camada de papel-toalha e placa de vidro N° 2.

Sobre a placa de vidro N° 2 foi colocado um peso com aproximadamente 200 g. Todo esse arranjo foi deixado por 2 h, à temperatura ambiente. Quando a transferência foi concluída, as membranas, já contendo os fragmentos de ADN, foram lavadas em solução 2x SSC (20x SSC= 3 M NaCl; 0,3 M citrato de trissódio, pH 7,0) por dois min e deixadas secar à temperatura ambiente, por 15 min. As membranas foram, então,

deixadas por 2 h, a 80°C, e estavam prontas para hibridização.

3.4.5. Sonda do fragmento pCuR2.A para hibridização

Esta técnica foi usada para obter a sonda com o ADN radioativo para hibridização com os fragmentos de ADN total de Xcc (descrito em 3.4.4).

0,6-0,7 µg de ADN (pCuR2.A) foi misturado com 30 µCi ³²P-α-dATP (3.000 Ci/mMol, Amersham), quatro µl do tampão 1x nick translation (5 mM MgCl₂; 5 mM Tris-HCl, pH 7,4), dois µl solução estoque de deoxinucleotídeos (10mMol/deoxinucleotídeo; dCTP, dTTP e dGTP) e um µl de DNA-polimerase (10 un/µl). Seguiu-se uma incubação por 90 min, à 16°C, e, a seguir, foi adicionado dois µl de 0,5 M EDTA para paralisar a reação.

3.4.6. Teste de incorporação

Para verificar se houve incorporação do nucleotídeo ³²P-α-ATP na sonda pCuR2.A durante a reação de "Nick Translation", foram feitos os procedimentos descritos a seguir. Um µl da sonda marcada foi pipetado em dois pedaços de papel-filtro (DE-81), e um deles submetido ao seguinte tratamento: em um tubo de plástico (Falcon), o filtro foi lavado seis vezes com 5-6 ml de solução 0,5 M Na₂HPO₄ (lavagens de cinco min), duas vezes com água destilada (lavagens de 30 s), e duas vezes com álcool 95°GL (lavagens

de 30 s). Os dois filtros (o lavado e o não lavado) foram examinados e comparados no cintilador em diferentes tubos de leitura. A homogeneidade no registro da leitura garantiu que houve incorporação.

3.4.7. Pré-hibridização

As membranas contendo o ADN transferido, a partir do gel, foram colocados em sacos plásticos com cinco ml de solução de hibridização (6x SSC; 0,5% SDS; 5x solução de Denhardt's, cuja composição é 6x SSC, albumina serica bovina 2%, Ficoll 2% e polivinil pirrolidone 2%). ADN não-homólogo (esperma de salmão) foi desnaturado através do aquecimento, à 100°C, por cinco min, e adicionado à solução de hibridização para uma concentração final de 500 µg/ml. Depois do selamento, o saco plástico foi incubado, à 65°C, por três h.

3.4.8. Hibridização

Depois da pré-hibridização, nos sacos plásticos contendo as membranas e a solução de hibridização foi adicionado todo o produto de preparação da sonda de pCuR2.A. A sonda foi previamente desnaturada, através do aquecimento, à 100°C, durante cinco min. O saco plástico foi novamente fechado e incubado, à 65°C, por, no mínimo, 16 h.

3.4.9. Lavagem

Depois da hibridização, as membranas foram removidas dos sacos plásticos e lavadas duas vezes em solução 2x SSC contendo 0,1% de SDS, à 65°, por 15 min. Uma lavagem final em 0,1x SSC foi seguida pela secagem, à temperatura ambiente e, depois, autoradiografadas.

3.4.10. Autoradiografia

As membranas foram envolvidas em plástico aderente (Saran) e fixadas em cassetes. A autoradiografia foi realizada usando filmes de Raio X (Fuji). Os cassetes foram deixados a -20°C por um tempo variável (1-10 dias), dependendo da intensidade da radioatividade das membranas.

3.5. Titulação da Virulência

A virulência de cada um dos 16 isolados de Xcc submetidos à avaliação do perfil de restrição plasmidial foi comparada entre si através da relação dose/probit-resposta. Células de cada isolado cultivado por 48 h, à 28°C, em meio LPA, foram coletadas com o auxílio de cotonetes, e suspensas em solução tampão fosfato 0,01 M (K_2HPO_4 , 1,13; KH_2PO_4 , 0,48 g/l). As suspensões de células de cada isolado foram ajustadas em espectrofotômetro para 0,3 de absorbância ($DO_{620} = 0,3$), calibrada com a solução tampão. Folhas de pomeleiro

(*Citrus paradisi* Macf.), plantas com quatro meses de idade, aproximadamente 30 cm de altura, foram marcadas com fitas coloridas. Três plantas por isolado, oito folhas por planta e duas folhas por diluição de células bacterianas foram inoculadas através da perfuração de cada folha em 10 pontos, cinco em cada lado da nervura principal. A perfuração foi feita com um conjunto de cinco alfinetes (0,5 cm de diâmetro) fixados em cortiça, eqüidistantes, esterilizados, diferentes para cada isolado, cujas pontas foram umedecidas na respectiva suspensão de células bacterianas. As plantas foram mantidas cobertas com saco plástico transparente durante 24 h antes e 120 h depois da inoculação em casa-de-vegetação, com temperaturas mínimas de 27,8 e 16,2 e máximas de 37,8 e 31,5°C na primeira e segunda vez, respectivamente, em que o experimento foi conduzido.

Avaliação. O resultado da inoculação foi considerado positivo quando havia a presença de calo corticóide, no local perfurado, 10 dias após a inoculação.

Obtenção das equações dose/probit-resposta. A relação dose/probit-resposta que fora estabelecida por ERCOLANI (1984), foi feita utilizando a tabela descrita por FINNEY (1971) e apresentada no Apêndice 4. As concentrações de células bacterianas, correspondendo às doses, foram 10, 1, 0,1 e 0,01, relativas às diluições de 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , respectivamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *citri*

Os isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye (Xcc) obtidos e utilizados neste trabalho são oriundos de municípios do Estado do Rio Grande do Sul importantes tanto no contexto de produção citrícola como de influência do cancro cítrico (CC) (Tabela 1). O isolado de São Sebastião do Caí (SSCs 131) provém da maior região produtora de frutas cítricas do Rio Grande do Sul. Os isolados provenientes da região das Missões (São Miguel das Missões e Santo Ângelo) representam locais onde atualmente desenvolvem-se projetos de expansão da citricultura. Os isolados de Uruguaiana e Bela União constituem-se em representantes da região fronteira com a Argentina.

Os isolados 106R.A E 106.B (Tabela 2) são bactérias que não foram identificadas e se caracterizaram, além da alta resistência ao cobre, por apenas promover reação de hipersensibilidade, quando inoculadas em folhas de laranjeira (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). 106R.A e 106R.B foram obtidos durante o processo de isolamento de Xcc a partir das folhas de laranjeira onde, provavelmente, desempenhavam a função de epífitas.

TABELA 1. Municípios de origem dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. citri e experimentos a que foram submetidos no presente trabalho.

Isolado	Município	Restrição Plasmidial	Titulação Virulência	Homologia Genes Cu ^r
URCs 101	Uruguaiana	+	+	+
URCs 102	Uruguaiana	+	+	+
URCs 103	Uruguaiana	-	-	+
URCs 104	Uruguaiana	+	+	+
BUCs 105	Bela União	-	-	+
BUCs 106	Bela União	+	+	+
BUCs 107	Bela União	-	-	+
SACs 108	Santo Ângelo	-	-	+
SACs 109	Santo Ângelo	-	-	+
SACs 110	Santo Ângelo	+	+	+
SACs 111	Santo Ângelo	+	+	+
SACs 112	Santo Ângelo	+	+	+
SMMCs 113	São Miguel das Missões	+	+	+
SMMCs 114	São Miguel das Missões	+	+	+
SACs 117	Santo Ângelo	+	+	+
SACs 118	Santo Ângelo	+	+	+
SMMCs 121	São Miguel das Missões	+	+	+
SACs 126	Santo Ângelo	+	+	+
SACs 128	Santo Ângelo	+	+	+
SACs 130	Santo Ângelo	+	+	+
SSCs 131	São Sebastião do Caí	+	+	+

+ e - representam a utilização, ou não, respectivamente, do isolado no referido experimento

TABELA 2. Outras bactérias utilizadas no presente trabalho

Isolado	Nome científico	Propriedades relevantes
HB 101	<i>Escherichia coli</i>	Vetor de plasmídeos
106R.A	Desconhecido	Resistência ao cobre
106R.B	Desconhecido	Resistência ao cobre

Folhas de laranjeira, inoculadas com as suspensões de células bacterianas de *Xcc*, apresentaram um amarelecimento puntiforme e translúcido, levemente saliente, entre 8 a 10 dias após a inoculação. Em seguida, o tecido afetado sofreu uma erupção "esponjosa", no início esbranquiçada e depois parda, com um halo amarelo.

Os isolados de *Xcc* não cresceram em meio tetrazólio caracterizando sua sensibilidade. A ausência de variação na coloração do meio HF (azul para amarelo) é indicativo de que os isolados não são fermentativos. As células dos isolados também caracterizaram-se por serem Gram-negativas.

4.2. Testes no meio CYE

A sensibilidade ao cobre dos 21 isolados de *Xcc*, testados em meio CYE, acrescido de diferentes quantidades de sulfato de cobre (CuSO_4), foi homogênea. A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada como 100 $\mu\text{g/ml}$ de CuSO_4 (40×10^{-2} mM) para todos os isolados. Estes resultados conferem aos 21 isolados a caracterização como sensíveis ao cobre, baseando-se em comparações com os valores das CMIs de outras

espécies e patovares de bactérias, também consideradas como sensíveis. MENKISSOGLU & LINDOW (1991b) também afirmam que a separação entre estirpes sensíveis e resistentes é baseada em diferenças na tolerância à concentração de cobre que podem ser de 10 até 80 vezes superior, o que definitivamente não foi o caso dos isolados de *Xcc*.

4.2.1. Sensibilidade ao cobre

Os cúpricos não têm sido utilizados com frequência e regularidade como componentes do controle do CC, o que provavelmente tem influência na sensibilidade de *Xcc* em relação ao cobre.

A indicação de que os isolados de *Xcc* utilizados no presente trabalho são sensíveis ao cobre poderia apresentar magnitudes diferentes se a relação com os cúpricos fosse próxima àquela dos casos de *X.c. pv. vesicatoria* (STALL et al., 1986) e *Pseudomonas syringae pv. syringae* (SUNDIN et al., 1989). Isolados de *Xcc* provenientes de regiões onde os cúpricos constituam-se em componentes freqüentes no combate ao CC, como a Argentina e Japão, poderiam apresentar CMIs com valores mais elevados. Experimentos em casa-de-vegetação com plantas cítricas sendo submetidas a aplicações de cúpricos seguido de inoculação com *Xcc* e posterior recuperação dessa bactéria pode se constituir em procedimento adequado para se obter isolados resistentes ao cobre.

A sensibilidade dos isolados ao cobre em meio CYE,

também constitui indicativo do estágio biológico ou evolutivo em que se encontra *Xcc* no Rio Grande do Sul, o que poderia ser devido à baixa frequência de mutação espontânea, e ausência de mecanismos especiais de resistência ao cobre.

4.2.2. Relação entre os testes "in vitro" e "in vivo"

MENKISSOGLU & LINDOW (1991b), ao fazerem avaliação da real concentração de íons de cobre livres no meio CYE, com diferentes quantidades de CuSO_4 , demonstraram que a adição de 100 $\mu\text{g/ml}$, ou seja, 40×10^{-2} mM de CuSO_4 conduz a uma concentração final aproximada de 0,31 $\mu\text{g/ml}$ ou $4,84 \times 10^{-3}$ mM de íons de cobre livres (Apêndice 1). Essa última concentração mencionada, expressa em pCu (logaritmo negativo da concentração molar de íons de cobre), assume o valor de 5,3 e representa a CMI obtida para *Xcc*. MENKISSOGLU & LINDOW (1991a) verificaram que a concentração máxima de íons de cobre detectadas nas folhas de laranjeira, 62 dias após a aplicação de CuSO_4 , era de 15×10^{-9} M ou pCu 7,8 (Apêndice 2). Ao comparar a CMI de *Xcc* com a concentração máxima registrada sobre as folhas de laranjeira poderia se supor que a aplicação de CuSO_4 jamais causaria toxidez à *Xcc*. Diga-se, porém, que *Xcc* dispõe de elementos nutricionais com maior facilidade em meio de cultura, no caso CYE, do que na superfície foliar, o que certamente promove diferenças na taxa de sobrevivência e crescimento. Testes para verificar a sobrevivência de *Xcc* em água com diferentes concentrações de

CuSO_4 , como fora feito para *P. syringae* (MENKISSOGLU & LINDOW, 1991b), podem indicar condições mais próximas às obtidas no campo. No entanto, os resultados obtidos sugerem que tratamentos com cúpricos seriam eficientes no controle do CC a nível de Rio Grande do Sul visto a sensibilidade da população de Xcc ao cobre.

4.3. Isolamento do ADN plasmidial

A lise celular promovida por lisozima não permitiu a adequada separação entre ácido deoxiribonucleico (ADN) cromossomal e plasmidial. A lise alcalina descrita por KADO & LIU (1981) apresentou melhores resultados, porém a presença de ADN cromossomal ocorria em muitas amostras, exigindo a repetição do processo de extração durante várias vezes. Tratamentos de lise alcalina, à 55-65°C, por 15 a 20 minutos, não foram eficientes para eliminar o ADN cromossomal e possivelmente o ADN plasmidial linear. Igualmente, aquecimento à 93-95°C, por cinco minutos, seguido por rápido resfriamento em banho de gelo, não diminuiu a quantidade de ADN linear.

Em gel agarose, as bandas resultantes da restrição do ADN plasmidial, normalmente se caracterizavam pela baixa intensidade de definição, como relatado por CIVEROLO (1985). A concentração de 0,7% de agarose nos gel demonstrou ser a mais adequada para separar os fragmentos de ADN plasmidial.

4.3.1. Características do ADN plasmidial

A presença de plasmídeos foi detectada em todos os 16 isolados de *Xcc* utilizados no experimento para determinação dos níveis de similaridade baseando-se nos perfis de restrição plasmidial. Considerou-se que a determinação dos níveis de similaridade utilizando 16 isolados, oriundos de municípios importantes em termos de citricultura, era apropriado como amostragem preliminar sobre *Xcc* ocorrente no Rio Grande do Sul.

Ocorreu o aparecimento de perfis de restrição plasmidial com características distintas, ou seja, com muita e pouca similaridade entre isolados. Os fragmentos de menor e maior dimensões proporcionado pela ação da enzima de restrição *HindIII* foram de 2,532 kb e 28,023 kb, respectivamente, enquanto que pela ação da enzima de restrição *BamHI* foram de 1,999 kb e 23,661 kb, respectivamente. Observa-se na Figura 1 a baixa definição de intensidade das bandas dos fragmentos plasmidiais confirmando os resultados obtidos por CIVEROLO (1985). Além disso, percebe-se que o perfil de restrição dos isolados URCs 102 (2), SMMCs 113 (3) e SACs 112 (4) apresentam número e posição de bandas com maior semelhança entre si em comparação com o isolado BUCs 106 (5). A Figura 2 apresenta os perfis de restrição dos isolados SSCs 131 (1), SMMCs 121 (2) e SACs 117 (3) demonstrando muita similaridade. As maiores diferenças entre isolados se limitam à ausência de algumas bandas do

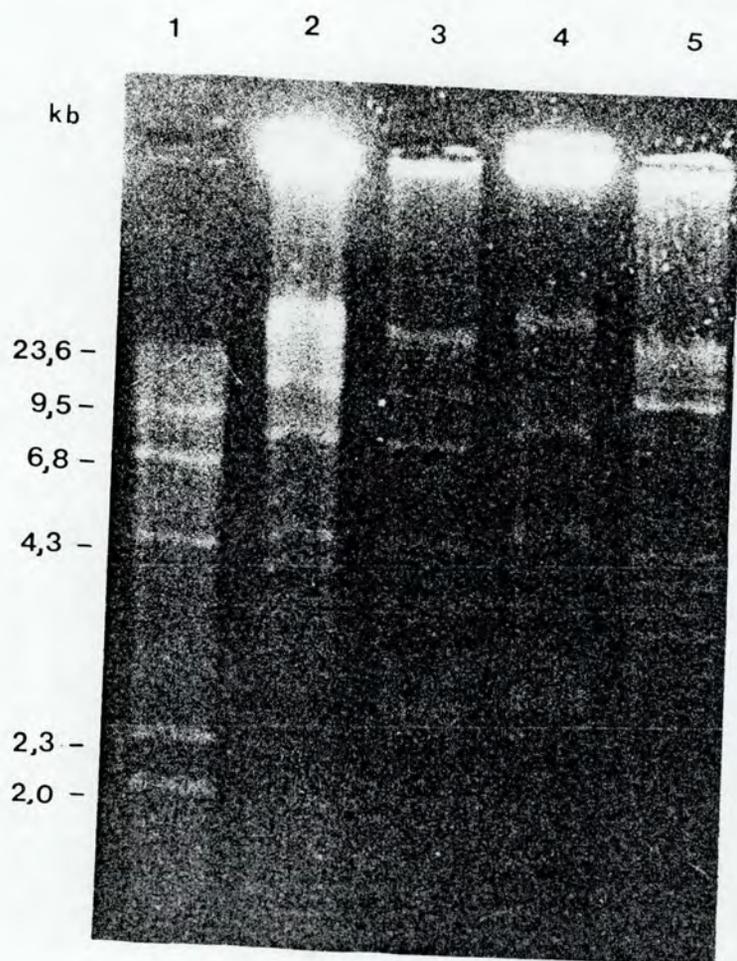


FIGURA 1. Perfil de restrição plasmidial dos isolados URCs 102 (2), SMMCs 113 (3), SACs 112 (4) e BUCs 106 (5) de *Xanthomonas campestris* pv. citri, digerido com *Bam*HI. O número 1 refere-se ao fago lambda digerido com *Hind*III.

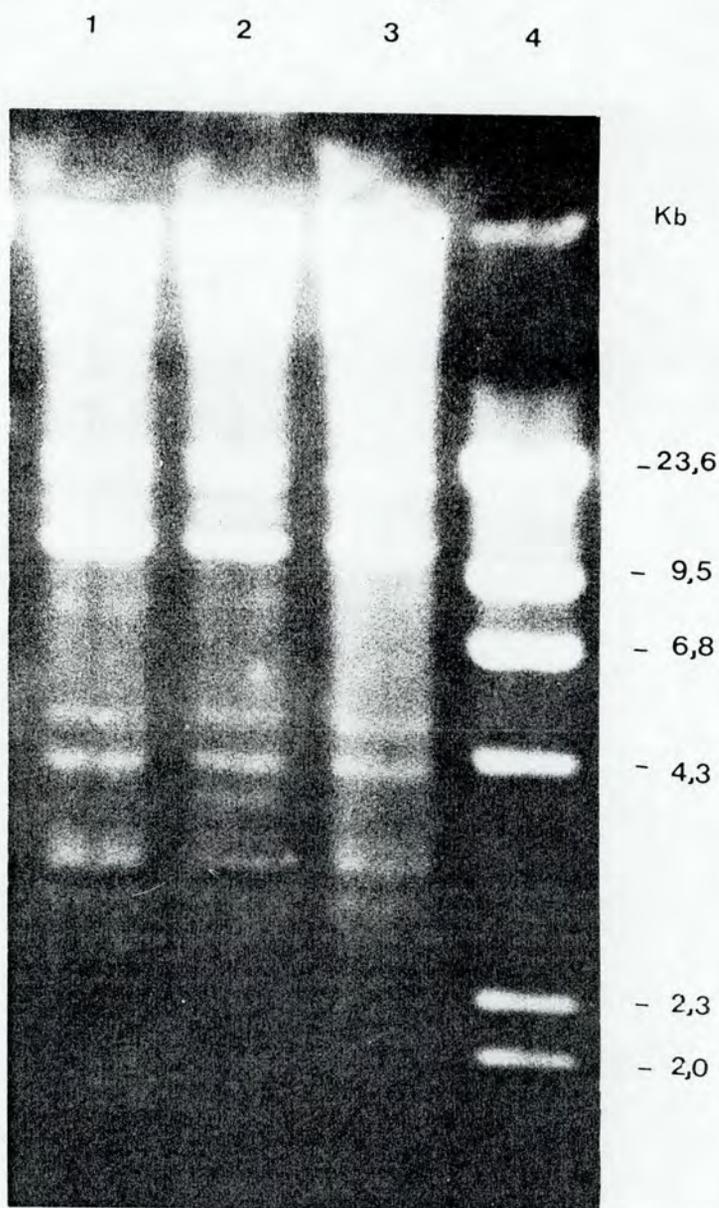


FIGURA 2. Perfil de restrição plasmidial dos isolados SSCs 131 (1), SMMCs 121 (2) e SACs 117 (3) de *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, quando digerido com *Bam*HI. O número 4 refere-se ao fago lambda digerido com *Hind*III.

isolado SACs 117 (3).

A opção pela avaliação dos perfis somente de plasmídeos digeridos foi baseada nos resultados obtidos por LAZO & GABRIEL (1987), os quais indicam que muitos patovares de *X. campestris* apresentam plasmídeos não-digeridos de dimensões iguais ou muito próximas, porém com perfis totalmente diferentes quando digeridos. A ocorrência de perfis similares de plasmídeos não-digeridos entre indivíduos diferentes, no caso, patovares, pode conduzir a erros de avaliação na eventualidade de usar esse processo na identificação. Quanto maior o número de bandas em gel de agarose de plasmídeos digeridos, menor a probabilidade de erro na identificação, pois aumentam os elementos para comparações.

4.3.2. Fragmentos comuns

Observou-se com frequência a presença de fragmentos plasmidiais de dimensões claramente inscritas dentro de determinados intervalos relativamente estreitos e com desvios padrões considerados pequenos. A ação de *Bam*HI proporcionou o aparecimento de fragmentos de ADN plasmidial com dimensões próximas a 4,1 kb (média de 4,144 kb; desvio padrão de 0,091 kb) em 62,5% dos isolados. A ação de *Hind*III resultou no aparecimento de fragmentos de ADN plasmidial com dimensões próximas a 6,8 kb (média de 6,829 kb; desvio padrão de 0,172 kb) e próximas a 9,6 kb (média de 9,601; desvio padrão

de 0,273 kb) em 62,5% e 50% dos isolados, respectivamente.

Os resultados obtidos, indicando que fragmentos plasmidiais com dimensões próximas a 4,1 kb, digeridos com *Bam*HI, foram encontrados em 62,5% dos isolados, se assemelham aos dados obtidos por PRUVOST et al. (1992), segundo os quais 85,2% de 42 estirpes pertencentes à forma A de CC apresentavam um fragmento plasmidial de 4,2 kb, também, quando da digestão com *Bam*HI. PRUVOST et al. (1992) quando utilizaram o fragmento mencionado acima, como sonda em sistema de hibridização radioativa, constataram a ocorrência de hibridização com o ADN total de todas as 42 estirpes pertencentes à forma A utilizadas em seu trabalho, e até estirpes pertencentes a outras formas (B, C e D). O uso de sondas a partir de fragmentos plasmidiais de *Xcc* em sistema de hibridização radioativa pode, então, se configurar em dispositivo aplicável na identificação do agente causador do CC.

O perfil de restrição de cinco isolados de *Xcc*, produzido pelas enzimas *Bam*HI e *Hind*III, é demonstrado na Tabela 3.

4.3.3. Avaliação do perfil de restrição

Os índices de similaridade entre isolados variaram muito em consequência da multiplicidade de fragmentos obtidos. A menor e a maior porcentagem de similaridade, resultante da média produzida pela ação das enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III foram de 13% para os isolados

TABELA 3. Perfil de restrição plasmidial de isolados de *Xanthomonas campestris* pv *citri*^a

Isolado: Enzima ^c :	Dimensão dos Fragmentos (pb) ^b									
	URCs 104		SACs 110		SMMCs 114		SACs 118		SACs 128	
	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B
	15523	11135	15523	14948	15283	9215	17018	10891	15162	10767
	9594	9467	9594	7585	6207	5835	9618	8714	10370	6143
	6719	4871	6719	5308	3049	3689	6970	4650	7047	4194
		4318		4582		3445		4086	4482	3266
						3233		3222		1999
						2498				

^aMédia de duas repetições

^bPares de bases estimados utilizando o fago lambda, digerido com *Hind*III, como padrão

^cH= *Hind*III; B= *Bam*HI

URCs 101 e SMMCs 114 e 86% para BUCs 106 e SACs 111 (Tabela 4).

O histograma de distribuição da frequência dos coeficientes de similaridade aponta para uma curva de distribuição normal e simétrica. Setenta e sete coeficientes, 64,01% do número total de comparações possíveis (120), apresentaram índices iguais ou superiores a 0,5 (Figura 3).

O fenograma (Figura 4) revelou a formação de pelo menos três grupos distintos e com índices de similaridade muito próximos dentro de cada grupo, indicando que a análise de perfis de restrição plasmidial pode ser utilizado na identificação de *Xcc*. A viabilidade da utilização do sistema de "fingerprint", baseado no perfil de restrição plasmidial de *Xcc*, dependerá da seleção de perfis de isolados realmente representativos de cada grupo, para comparações com isolados sem identificação. Observou-se que todos os isolados apresentaram bastante homogeneidade dentro de cada grupo definido hierarquicamente. Nesse aspecto, com exceção do isolado SACS 112, a análise hierárquica estabeleceu que todos os demais isolados apresentavam porcentagens de similaridade de, no mínimo, 50% (0,5) dentro de cada grupo que, em termos fenológicos, expressam justamente homogeneidade.

Deve-se destacar que a análise hierárquica não revelou a existência de relação entre a origem dos isolados (municípios) e o nível de similaridade. Esta última afirmativa pode ser representada pelo caso dos isolados

TABELA 4. Porcentagem de similaridade entre isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* baseado no perfil de restrição do ADN plasmidial digerido com *Bam* H I e *Hind* III

Isolado	SIMILARIDADE (%)*																
	101	102	104	106	110	111	112	113	114	117	118	121	126	128	130	131	
URCs 101		83	33	45	33	37	37	50	13	29	31	44	53	48	28	57	
URCs 102			42	41	42	31	17	29	20	37	39	52	62	40	35	65	
URCs 104				55	62	79	48	29	64	80	78	77	78	65	60	65	
BUCs 106					80	86	71	39	49	63	51	70	71	71	65	71	
SACs 110						79	62	29	43	70	56	77	64	65	53	57	
SACS 111							50	31	56	72	58	80	67	55	63	54	
SACS 112								62	39	44	42	37	33	41	63	34	
SMMCs 113									63	46	39	44	45	62	53	58	
SMMCs 114										67	53	47	67	70	47	60	
SACs 117											60	80	67	70	72	70	
SACs 118												67	71	59	58	53	
SMMCs 121													80	68	76	67	
SACs 126														80	63	83	
SACs 128															39	50	
SACs 130																	67
SSCs 131																	

*Média de duas repetições

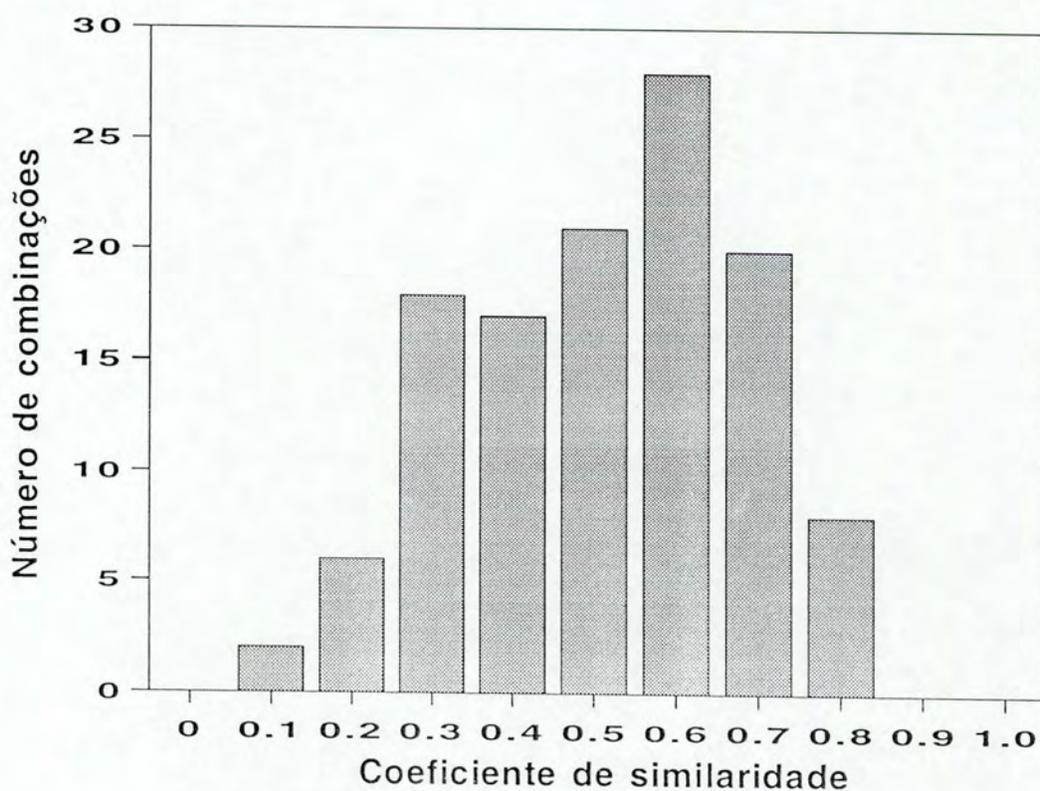


FIGURA 3. Histograma da distribuição do coeficiente de similaridade do perfil de restrição plasmidial entre isolados de *Xanthomonas campestris* pv. citri.

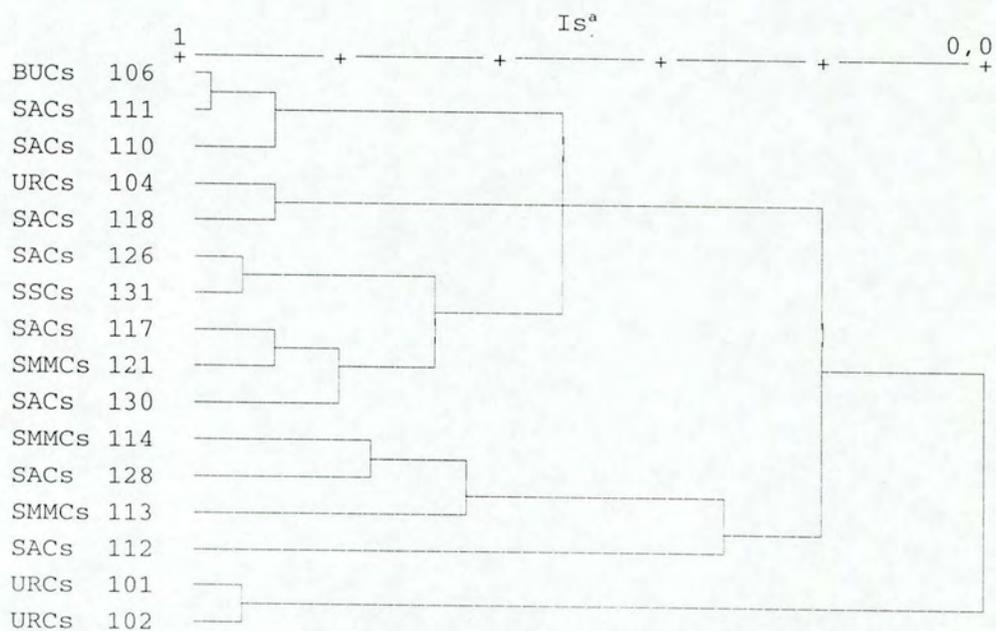


FIGURA 4. Fenograma de similaridade da relação entre os isolados de *Xanthomonas campestris* pv. citri, utilizando o método de ligação completa.
^aÍs = Índice de Similaridade

SSCs 131 e SACs 126 que apresentaram extrema similaridade, mas, no entanto, são originários de regiões distantes (São Sebastião do Caí e Santo Ângelo, respectivamente).

O fenograma foi obtido pelo método de ligação completa e apresenta uma distribuição muito próxima àquela obtida por PRUVOST et al. (1992), com a formação, também, de pelo menos três grupos distintos para estirpes pertencentes à forma A.

A utilização de ADN plasmidial, seja em sistema de "fingerprint" ou "restriction fragment length polymorphisms" (RFLP), poderá constituir-se em sistema auxiliar na identificação de *Xcc*, embora com limitações. Não se encontrou relatos na literatura sobre a determinação de qual seja a técnica mais adequada, dentre as tantas utilizadas e já mencionadas (2.5.2.), para caracterizar a bactéria causadora do CC, embora maioria dos pesquisadores sobre o assunto, evitem comparações. Ao que parece porém, é que todas as técnicas utilizadas, como fora observado quando da utilização do ADN plasmidial em sistemas "fingerprint", também apresentam limitações. Além disso, de acordo com KRAWIEC (1985), o ADN isoladamente não contempla todas as diferenças entre indivíduos, no caso, bactérias.

Trabalhos com mais isolados, e oriundos de regiões ou países diferentes, provavelmente fornecerão uma melhor dimensão sobre a utilidade do ADN plasmidial para identificação de *Xcc*.

4.4. Homologia com a sonda pCuR2.A

A homologia entre o ADN total dos 21 isolados de *Xcc* e o fragmento pCuR2.A de *X.c. pv. vesicatoria* não foi constatada através do teste de hibridização por sonda radioativa. Nesse aspecto, a Figura 5 revela que não houve hibridização entre o ADN total de 10 isolados de *Xcc* (URCs 101, URCs 103, URCs 104, BUCs 107, SACs 108, SACs 109, SACs 110, SACs 111, SMMCs 113 e SSCs 131) e dois isolados bacterianos (106R.A e 106R.B), sem classificação conhecida e com alta resistência ao cobre (CMI de CuSO_4 , em meio CYE, igual a 112×10^{-2} mM), em relação ao fragmento pCuR2.A de *X.c. pv. vesicatoria*.

A ausência de homologia entre o ADN total dos 21 isolados de *Xcc* e a sequência clonada pCuR2.A, oriunda de estirpe de *X.c. pv. vesicatoria* com resistência ao cobre, está de acordo com a sensibilidade ao cobre apresentada por eles em meio de cultura CYE. Apesar da sintonia entre resultados, o fato da sonda pCuR2.A não ter hibridizado com o ADN total dos 21 isolados, constitui-se em indicativo muito consistente, mas não definitivo, sobre a ausência de qualquer sequência capaz de promover resistência ao cobre em *Xcc*. GARDE & BENDER (1991) não conseguiram detectar hibridização entre o ADN total de estirpes de *X.c. pv. vesicatoria* com resistência ao cobre e a sonda (4,4 kb) do plasmídeo pPT23D (BENDER & COOKSEY, 1987) envolvido com resistência ao cobre em *P. syringae pv. tomato*. Neste caso é possível que a

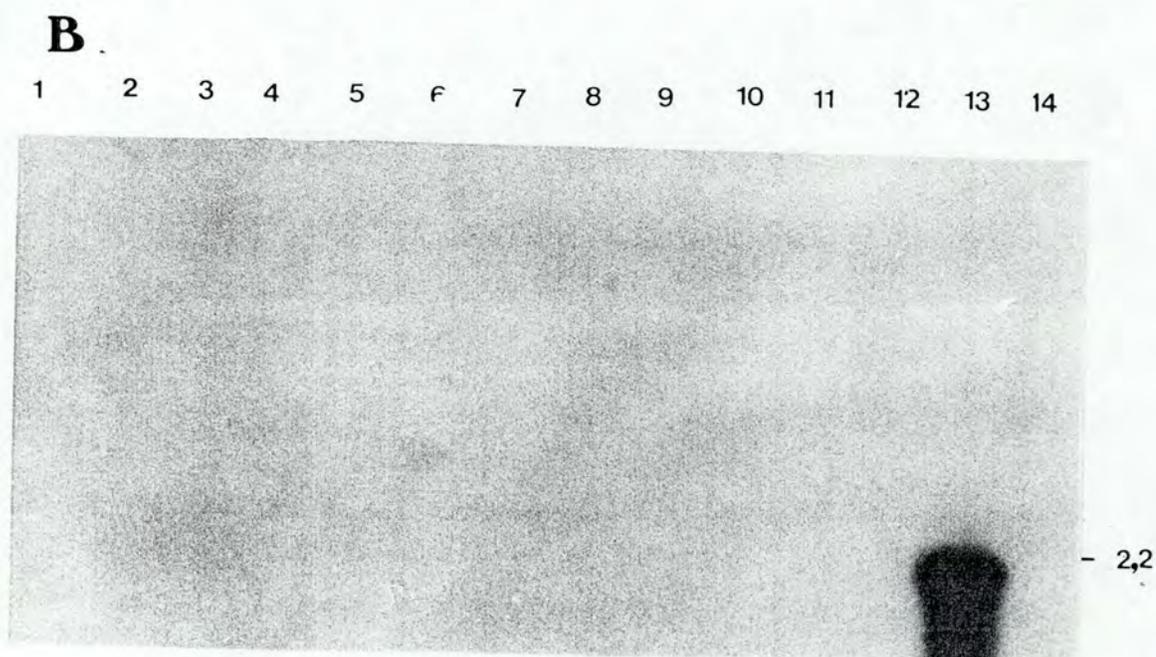
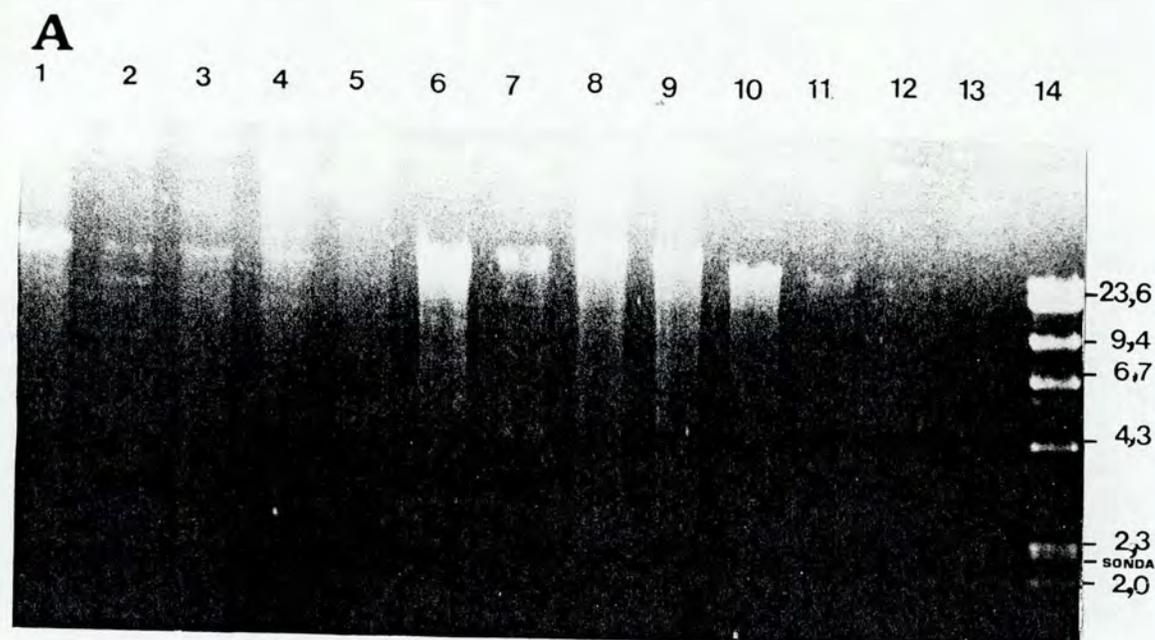


FIGURA 5. ADN total dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* digeridos com *Hind*III(A). "Southern blot" do ADN total dos isolados de *X. c. pv. citri* com a sonda pCur2.A (B). Os números representam os isolados URCs 101 (1), URCs 103 (2), URCs 104 (3), BUCs 107 (4), SACs 108 (5), SACs 109 (6), SACs 110 (7), SACs 111 (8), SMMCs 113 (9), SSCs 131 (10), 106R.A (11), 106R.B (12). O número 13 é a sonda pCur2.A e o 14 é o fago lambda digerido com *Bam*HI e *Hind*III.

a ausência de hibridização, proporcionada pela ausência de homologia, entre as sequências de ADN responsáveis pela mesma função fenotípica, no caso, resistência ao cobre, deva-se ao fato de que os mecanismos de resistência para as duas espécies de bactérias sejam diferentes.

A ausência de sequências altamente homólogas provavelmente seja a razão para a não-detecção de hibridização entre o ADN total dos dois isolados resistentes ao cobre, 106R.A e 106R.B, com a sonda pCuR2.A.

4.5. Titulação da virulência

A titulação da virulência de 16 isolados de *Xcc* foi obtida a partir da inclinação das retas da relação dose/probit-resposta. Nenhum isolado induziu a formação de calo corticóide nas folhas de pomeleiro (*Citrus paradisi* Macf.) quando usado na menor concentração, ou seja, 0,01 , nas duas vezes em que o experimento foi conduzido. Enquanto que quatro isolados induziram este sintoma na segunda concentração, 0,1 , no segundo experimento.

A variação nos coeficientes de inclinações das retas (Tabela 5), obtidas a partir dos valores médios dos dois experimentos, registram uma diferença de 0,25. Os maiores coeficientes de inclinações das retas foram obtidas com os isolados SACs 126 (0,35) e SACs 110 (0,34), e a menor foi obtida pelo isolado URCs 104 (0,10).

TABELA 5. Equações lineares e da relação entre a concentração de células de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. citri e a reação de folhas de pomeleiro (*Citrus paradisi* Macf.)

Isolado	Equação
URCs 101	$y = 0,18x + 3,5^*$
URCs 102	$y = 0,19x + 3,63$
URCs 104	$y = 0,10x + 4,85$
BUCs 106	$y = 0,15x + 4,57$
SACs 110	$y = 0,34x + 3,1$
SACs 111	$y = 0,21x + 3,88$
SACs 112	$y = 0,12x + 4,68$
SMMCs 113	$y = 0,15x + 4,65$
SMMCs 114	$y = 0,12x + 4,23$
SACs 117	$y = 0,15x + 4,65$
SACs 118	$y = 0,24x + 3,91$
SMMCs 121	$y = 0,21x + 4,32$
SACs 126	$y = 0,35x + 2,9$
SACS 128	$y = 0,27x + 3,78$
SACs 130	$y = 0,26x + 4,27$
SSCs 131	$y = 0,24x + 4,39$

*Média da avaliação de seis plantas inoculadas com um isolado em experimento conduzido duas vezes

As inclinações das retas foram maiores no primeiro do que no segundo experimento (dados não apresentados), devido, provavelmente, à temperatura mais elevada.

As diferenças nas inclinações de retas confirmam a existência de isolados com maior virulência no Rio Grande do Sul. Essa informação é importante no sentido de se conhecer as características de Xcc e dimensionar os limites de eventuais medidas de controle como, por exemplo, o melhoramento de plantas.

Correlação entre a virulência e o perfil de restrição plasmidial. Os dois isolados mais virulentos (SACs 126 e SACs 110) foram utilizados para verificação do nível de correlação entre o índice de similaridade com os demais isolados, estabelecido pelo perfil de restrição plasmidial, e os coeficientes de inclinação das retas obtidas pela relação dose/probit-resposta. O objetivo era verificar se a distribuição dos índices de similaridade de todos os isolados, quando comparados com o isolado de maior virulência, apresentava-se ordenada, decrescente e com relação direta com a distribuição nominal dos coeficientes de inclinação das retas determinado para cada isolado. Os índices de correlação obtidos foram $r = 0,148$, $t = 0,5398$ (Prob.> $t = 0,6038$) e $r = 0,301$, $t = 1,1362$ (Prob.> $t = 0,2761$) em relação aos isolados SACs 110 e SACs 126, respectivamente. Os índices de correlação (t e r) foram considerados insatisfatórios para estabelecer uma relação direta e linear entre virulência e perfil plasmidial

(Figura 6 e 7).

Reconhecimento de regiões específicas. Como os níveis de similaridade entre isolados foram determinados em função da homologia entre as sequências de ADN plasmidial, uma vez que as endonucleases promovem a clivagem de ADN em sequências específicas, decidiu-se verificar a correlação entre perfil de restrição plasmidial e virulência. Em síntese, buscava-se determinar se as diferenças observadas em relação à homologia, em regiões específicas de ADN plasmidial e, reconhecidas pelas endonucleases, eram correlacionadas com as diferenças observadas em relação à virulência. Se houvesse uma tendência de que, por exemplo, os isolados considerados mais virulentos, definidos pela relação dose/probit-resposta, apresentassem índices de similaridade elevados entre si, definidos pelo perfil de restrição plasmidial, a hipótese de correlação entre perfil de restrição plasmidial e virulência seria confirmada. O que deveria ocorrer igualmente, é que os isolados de menor virulência deveriam apresentar maior similaridade entre si, fato este, também não confirmado estatisticamente. Em função da inexistência de correlação, supõe-se que o ADN cromossomal seja responsável pela função fenotípica da virulência.

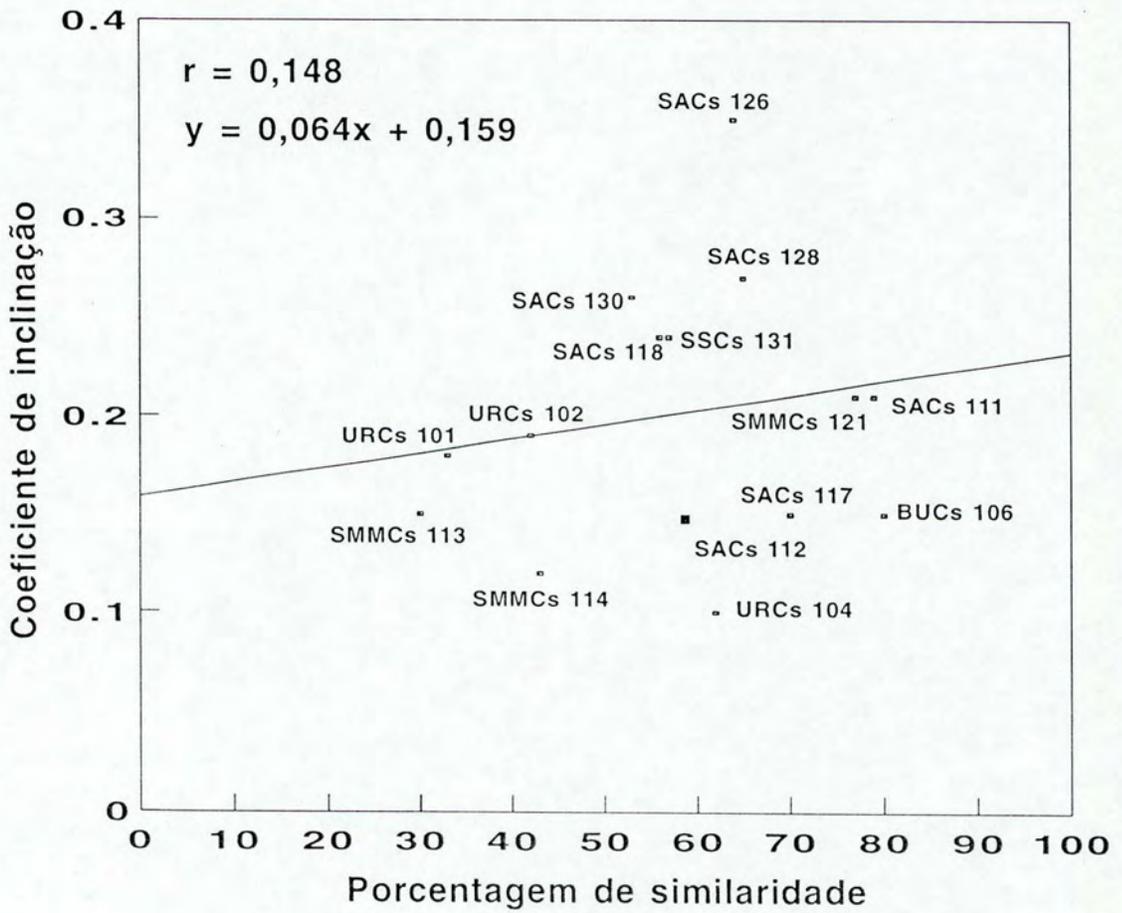


FIGURA 6. Análise de correlação linear entre a similaridade plasmidial com o isolado SACs 110 e a virulência de 15 isolados de *Xanthomonas campestris* pv. citri.

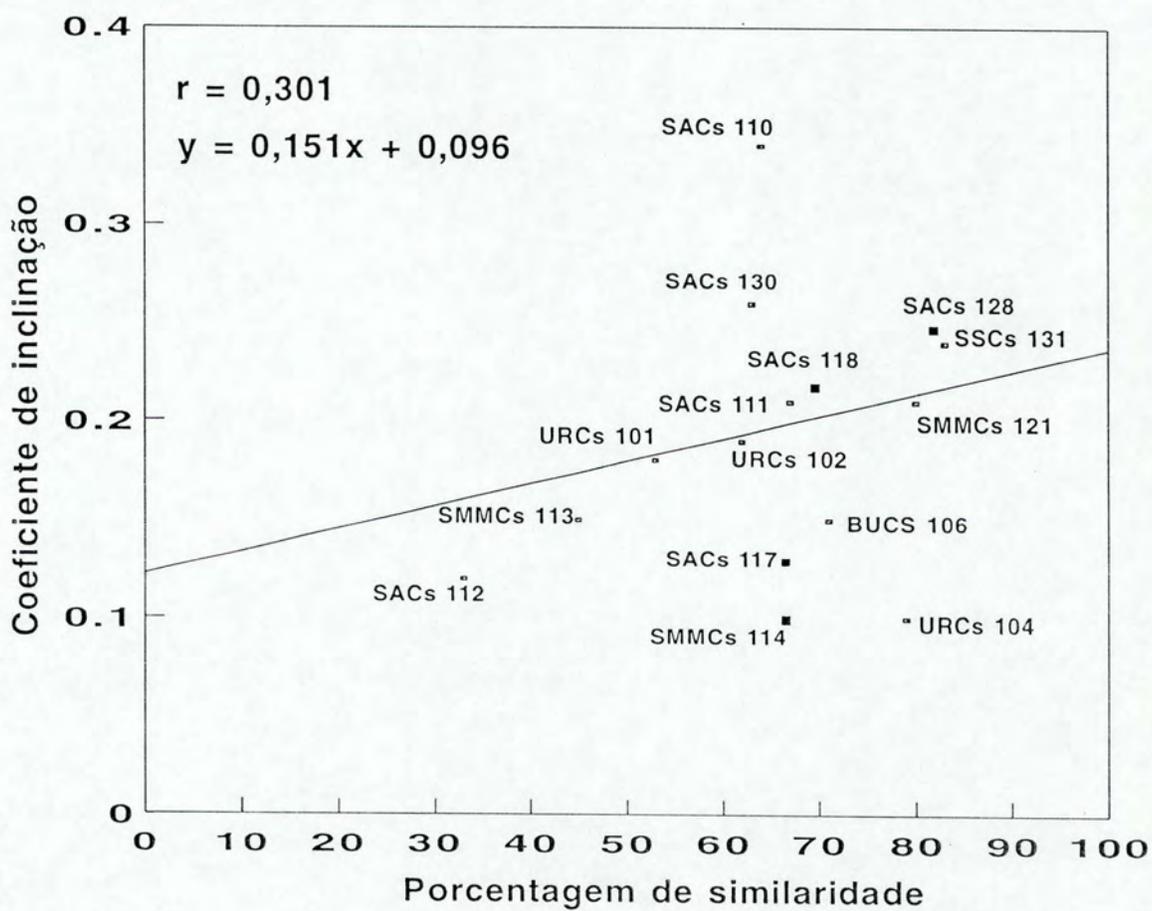


FIGURA 7. Análise de correlação linear entre a similaridade plasmidial com o isolado SACs 126 e a virulência de 15 isolados de *Xanthomonas campestris* pv. citri.

5. CONCLUSÕES

1. Os isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye (*Xcc*) são sensíveis ao cobre.
2. Os resultados obtidos sugerem que tratamentos com cúpricos seriam eficientes no controle do cancro cítrico a nível de Rio Grande do Sul visto a sensibilidade de *Xcc* ao cobre.
3. O uso de perfis de restrição plasmidial na identificação de *Xcc* dependerá da escolha de perfis representativos dos grupos definidos hierarquicamente para eventuais comparações.
4. A conservação de determinados fragmentos plasmidiais indica possibilidade de uso de sondas plasmidiais na identificação de *Xcc*.
5. Se o conteúdo genômico dos isolados de *Xcc* codifica resistência ao cobre, a sequência de nucleotídeos não é homóloga à apresentada por *X. c.* pv. *vesicatoria*.
6. As diferenças na virulência não se correlacionaram com diferenças no perfil de restrição do ADN plasmidial dos isolados de *Xcc*, sugerindo que o ADN cromossomal seja o responsável pela fenotipia em questão.

5. BIBLIOGRAFIA CITADA

- ALVAREZ, A. M.; BENEDICT, A. A. 1990. Relationships among phytopathogenic bacteria distinguished with monoclonal antibodies. In: INTERNATIONAL CONFERENCE PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 7., 1990, Budapest. **Proceedings...** Budapest, Akademiai Kiado. p.859-863.
- ALVAREZ, A. M.; BENEDICT, A. A.; MIZUMOTO, C. Y.; CIVEROLO, E. L. 1987. Mexican lime bacteriosis examined with monoclonal antibodies. In: CIVEROLO, E. L.; COLMER, A.; DAVIS, R. E.; GILLASPIE, A. G. (Ed.). **Plant pathogenic bacteria**. Current plant science and biotechnology in agriculture. Dordrecht, Netherlands. p.847-852.
- BACH, E. E.; ALBA, A. P. C.; NETO, J.R. 1982. Detection of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye by enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA). **Fitopatologia**, Santiago do Chile, v. 7, p.407-415.
- BENDER, C. L.; COOKSEY, D.A. 1987. Molecular cloning of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **J. Bacteriol.**, Whashington, v. 165, p.470-474.
- BENDER, C. L.; MALVICK, D. K.; KENNETH, E.C.; STEVEN, G.; PRATT, P. 1990. Characterization of pXV10A, a copper resistance plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Whashington, v. 57, p.2724-2730.
- BRADBURY, J. F. 1984. Genus II. *Xanthomonas*. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore, Williams & Wilkins. V. 1, p.199-210.
- BROADBENT, P.; FAHY, P. C.; GILLINGS, M. R.; BRADLEY, J.K.; BARNES, D. 1992. Asiatic citrus canker detected in a pummelo orchard in northern Australia. **Plant Dis.**, St. Paul, v. 76, p.824-829.
- BROWN, N. L.; ROUCH, D. A.; LEE, B. T. O. 1992. Copper determinants in bacteria. **Plasmid**, New York, v. 27, p.41-51.

- CIVEROLO, E. L. 1985. Indigenous plasmids in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 75, p.524-528.
- CIVEROLO, E. L. 1975. Quantitative aspects of pathogenesis of *Xanthomonas pruni* in peach leaves. *Phytopathology*, St. Paul, v. 65, p.258-264.
- CIVEROLO, E. L.; FAN, F. F. 1982. *Xanthomonas campestris* pv. *citri* detection and identification by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Dis.*, St. Paul, v. 66, p.231-236.
- COOKSEY, D. A. 1993. Copper uptake and resistance in bacteria. *Molecular Microbiology*, Salem, v. 7, p.1-5.
- COOKSEY, D. A. 1990. Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.*, Palo Alto, v. 28, p.201-219.
- COPLIN, D. L. 1982. Plasmid in plant pathogenic bacteria. In: MOUNT, M. S.; LACY, G. L. (ed.). *Phytopathogenic prokariotes*. New York, Academic. v. 2, 506p., p.225-280.
- COPLIN, D. L. 1989. Plasmids and their role in the evolution of plants pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.*, Palo Alto, v. 26, p.285-312.
- DYE, D. W.; BRADBURY, J. F.; GOTO, M.; HAYWARD, A. C.; LELLIOT, R.A.; SCHROTH, M. N. 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Rev. Plant Pathol.*, Farnham Royal, v. 59, p.153- 168.
- DYE, D. W.; LELLIOT, R. A. 1974. *Xanthomonas* Dowson 1939. In: BUCHANAN, R. E.; GIBBONS, N. E. (Ed.). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8th ed. Baltimore, Willians & Wilkins. p.243.
- EGEL, D. S.; GRAHAM, J. H.; STALL, R. E. 1991. Genomic relatedness of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of citrus. *Appl. Environ. Microbe*, Whashington, v. 57, p.2724-2730.
- ERCOLANI, G.L. 1984. Infectivity titration with bacterial plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.*, Palo Alto, v. 22, p.35-52.
- FINNEY, D. J. 1971. *Probit analysis*. 3.ed. Cambridge, Cambridge Univ. Press. 333p.

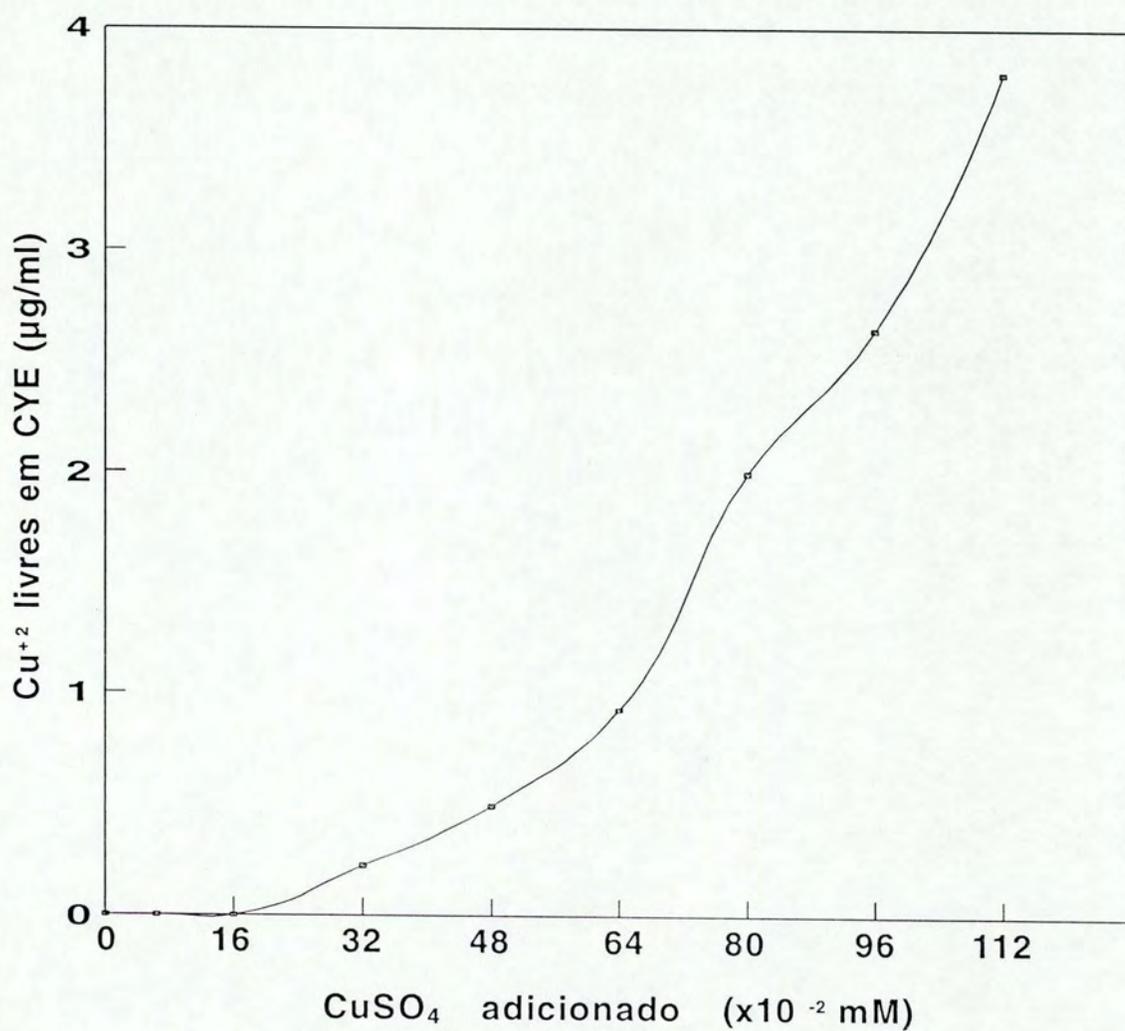
- GABRIEL, D. W. 1985. Four plasmid DNA variants in 1984 Florida citrus canker epiphytotic. (Abstr.) *Phytopathology*, St. Paul, v. 75, p.1320.
- GABRIEL, D. W.; HUNTER, J. E.; KINGSLEY, M. T.; MILLER, J. W.; LAZO, G. R. 1988. Clonal population structure of *Xanthomonas campestris* and genetic diversity among citrus canker strains. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, St. Paul, v.1, p.59-65.
- GABRIEL, D. W.; KINGSLEY, M. T.; HUNTER, J. E.; GOTTWALD, T. 1989. Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) to species and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Whashington, v. 39, p.14-22.
- GARDE, S.; BENDER, C.L. 1991. DNA probes for detection of copper resistance genes in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Whashington, v. 57, p.2435-2439.
- GITAITIS, R. D.; McINNESS, T. B.; JONES, J. B. 1985. A survey of Georgia and Florida for the presence of copper tolerant phytopathogenic bacteria. *Phytopathology*, St. Paul, v. 75, p.1288 (Abstr.).
- HAMLIN, S. A. 1967. Studies on occurrence of pathotypes in *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson. *The Punjab Hortic. J.*, Patiala, India, v. 7, p.90-93.
- HARTUNG, J. S. 1992. Plasmid-based hybridization probes for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. *Plant Dis.*, St. Paul, v. 76, p.889-893.
- HARTUNG, J. S.; CIVEROLO, E. L. 1987. Genomic fingerprints of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* strains from Asia, South America and Florida. *Phytopathology*, St. Paul, v. 77, p.282-285.
- HARTUNG, J. S.; CIVEROLO, E. L. 1989. Restriction fragment length polymorphisms distinguish *Xanthomonas campestris* strains isolated from Florida citrus nurseries from *X. c.* pv. *citri*. *Phytopathology*, St Paul, v. 79, p.793-799.
- JAIN, R. K. 1990. Copper-resistant microorganisms and their role in the environment. *World J. Mycobiol. Biothechnol.*, Oxford, v. 6, p.356-365.
- KADO, C. I.; LIU, S. -T. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.*, Whashington, v. 145, p.1365-1373.

- KRAWIEC, S. 1985. Concept of a bacterial species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Washington, v. 35, p.217-220.
- LAZO, G. R.; GABRIEL, D.W. 1987. Conservation of plasmid DNA sequences and pathovar identification of strains of *Xanthomonas campestris*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 77, p.448-453.
- LEITE Jr., R. P. 1987. Situation and control perspectives of the citrus bacterial canker disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye in the state of Parana, Brazil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF THE CITRUS CANKER, DECLINIO/BLIGHT AND SIMILAR DISEASES, 1987, São Paulo. **Abstracts**. São Paulo, SBF, 56p., p.24.
- LIN, B. -C.; DAY, H. -I.; CHAN, S. -J.; CHIEN, M. -C. 1979. Isolation and characterization of plasmids in *Xanthomonas manihotis*. *Bot. Bull. Acad. Sinica*, Taipei, v. 20, p.150-171.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. 1982. **Molecular cloning, a laboratory manual**. New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- MARCO, G. M.; STALL, R. E. 1983. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. *Plant dis.*, St. Paul, v. 67, p.779-781.
- MEINKOTH, J.; WAHL, G. M. 1987. Nick translation. In: SHELBY, L. B; KIMMEL, A. R. (Ed.). **Guide to molecular cloning techniques**. Maryland, AP. V. 152, p.91-94.
- MENKISSOGLU, O.; LINDOW, S. E. 1991a. Chemical forms of copper on leaves in relation to the bactericidal activity of cupric hydroxide deposits on plants. *Phytopathology*, St. Paul, v. 81, p.1263-1270.
- MENKISSOGLU, O.; LINDOW, S. E. 1991b. Relationship of free ionic copper and toxicity to bacteria in solutions of organic compounds. *Phytopathology*, St. Paul, v. 81, p.1258-1262.
- PRUVOST, O.; HARTUNG, J. S.; CIVEROLO, E. L.; DUBOIS, C.; PERRIER, X. 1992. Plasmid DNA fingerprints distinguish pathotypes of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, the causal agent of citrus bacterial canker disease. *Phytopathology*, St. Paul, v. 82, p. 485-490.
- SANTOS, C. F. de O. 1991. Cancro cítrico: ocorrência no Brasil e seu combate. In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F.; POMPEU Jr., J.; AMARO, A. S. (Ed.). **Citricultura brasileira**. 2.ed. Campinas, Fundação Cargil. p.787-823.

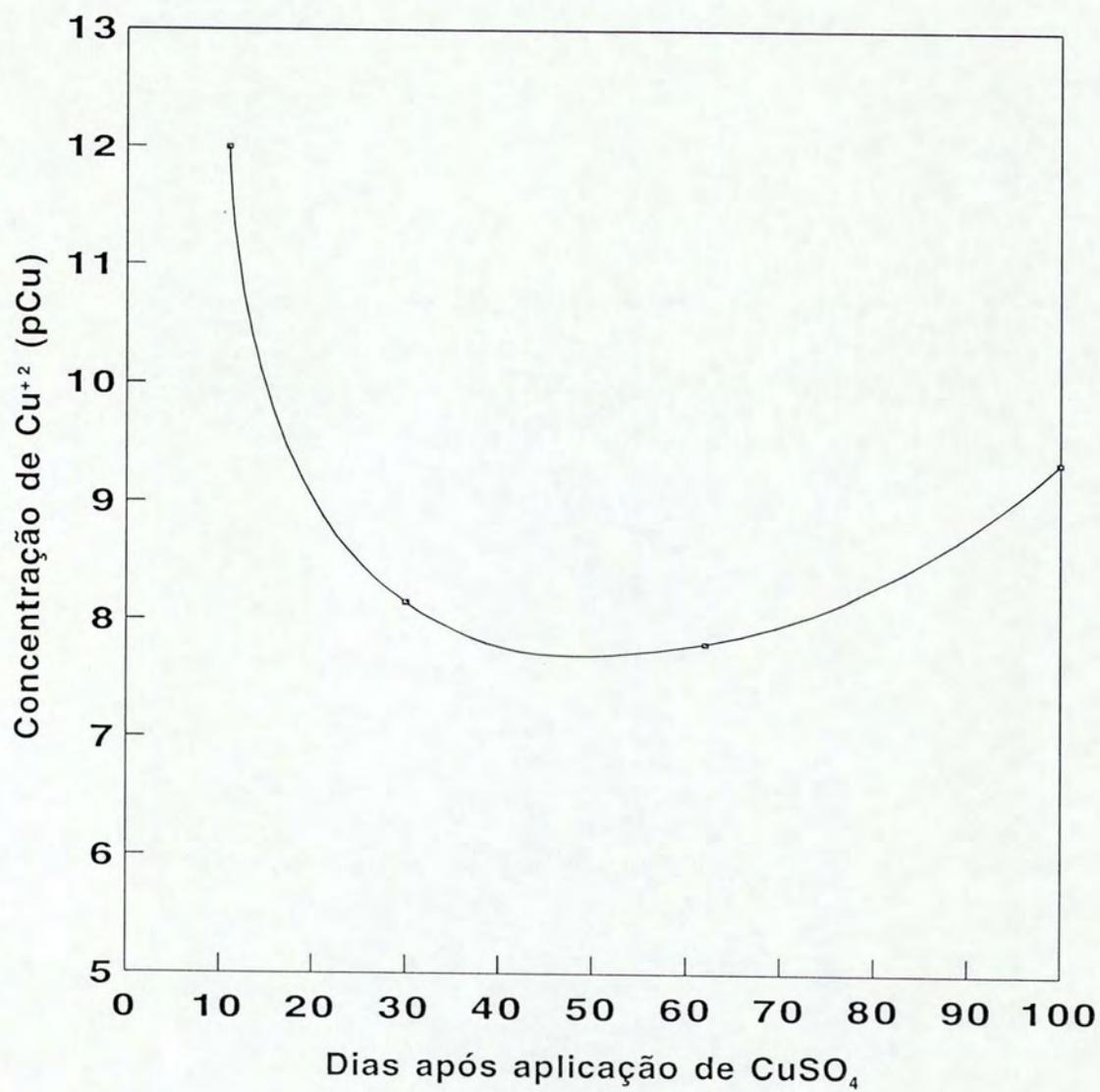
- SAS Institute. 1987. **SAS/STAT Guide for personal computers**. 6.ed. Cary, NC, SAS Institute. 1,028p.
- SCHOULTIES, C. L.; CIVEROLO, E. L.; MILLER, J. W.; STALL, R. E.; KRASS, C. J.; POE, S. R.; Du CHARME, E. P. 1987. Citrus canker in Florida. **Plant Dis.**, St. Paul, v. 71, p.388-395.
- SCOTT, D. A.; MARC, W.; LEUNG, F. C. 1993. A computer program to aid in calculating similarity indexes from DNA fingerprints. **Biotechniques**, Natick, Mass., v. 14, p.980-983.
- SOUTHERN, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J. Mol. Biol.**, London, v. 98, p.503.
- SOUZA, E. C. 1987. Plasmídios bacterianos. In: COSTA, O. P. da. (Ed.). **Genética molecular e de microorganismos**. Os fundamentos da engenharia genética. São Paulo, Manole. p.273-289.
- STALL, R. E. 1980. Lucha contra la cancrrosis. In: CANCRO CÍTRICO (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*): bibliografía analítica. São Paulo, Instituto Biológico. Parte I, p.184, Resumen n° 1032.
- STALL, R.E.; ECHENIQUE, B.I.C.; MARCO, G.M. 1980. Calendario de aplicaciones para el control de cancrrosis en cítricos. In: CANCRO CÍTRICO (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*): bibliografía analítica. São Paulo, Instituto Biológico. Parte II, p.185, Resumen n° 1036.
- STALL, R. E.; LOSCHKE, D. C.; JONES, J. B. 1986. Linkage of copper resistance and avirulence loci on a self-transmissible plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology**, St. Paul, v.76, p.240-243.
- STALL, R. E.; SEYMOUR, C. P. 1983. Canker, a threat to citrus in the Gulf-Coast States. **Plant Dis.**, St. Paul, v. 67, p.581-585.
- STRIPECKE, R.; ROSATO, Y. B. 1988. Variabilidade no perfil eletroforético de alfa-esterases e plasmídios em patovares de *Xanthomonas campestris*. **Fitopatol. bras.**, Brasília, v. 13, p.358-351.
- SUNDIN, G. W.; JONES, A. L.; FULBRIGHT, D. W. 1989. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from cherry orchards and its associated transfer in vitro and in planta with a plasmid. **Phytopathology**, St. Paul, v. 79, p.861-865.

- TAUTZ, D.; RENZ, M. 1983. An optimized freeze-squeeze method for the recovery of the DNA from agarose gels. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 132, p.14-19.
- TIMMER, L. W. 1988. Characteristics and management of postbloom fruit drop. **Citrus & Vegetable Magazine**, Tampa, p.12-13.
- ULAGANATHAN, K.; MAHADEVAN, A. 1990. Plasmid screening in some of the Indian strains of plant pathogenic bacteria. In: INTERNATIONAL CONFERENCE PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 7., 1990, Budapest. **Proceedings...** Budapest, Academiai Kiado. p.413-418.
- YOUNG, J. M.; BRADBURY, J. F.; GARDAN, L.; GVOZDYAK, R. I.; STEAD, D. E.; TAKIKAWA, Y.; VIDAVER, A. K. 1991. Comment of reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse 1915) Gabriel et al. 1989 and *X. phaseoli* (ex Smith 1897) Gabriel et al. 1989: indication of need for minimal standards for the genus *Xanthomonas*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Whashington, v. 41, p.172-177.
- ZEVENHUIZEN, L. P. T. M.; DOLFING, J.; ESHUIS, E. J.; SCHOLTEN-KOERSELMAN, I. J. 1979. Inhibitory effects of copper on bacteria related to the free ion concentration. **Microbial ecology**, New York, v. 5, p.139-146.
- WINNACKER, E. L. 1987. **From genes to clones: Introduction to gene technology**. Transl. by Horst Ibelgaufts. Weinheim; New York, VHC, p.634.

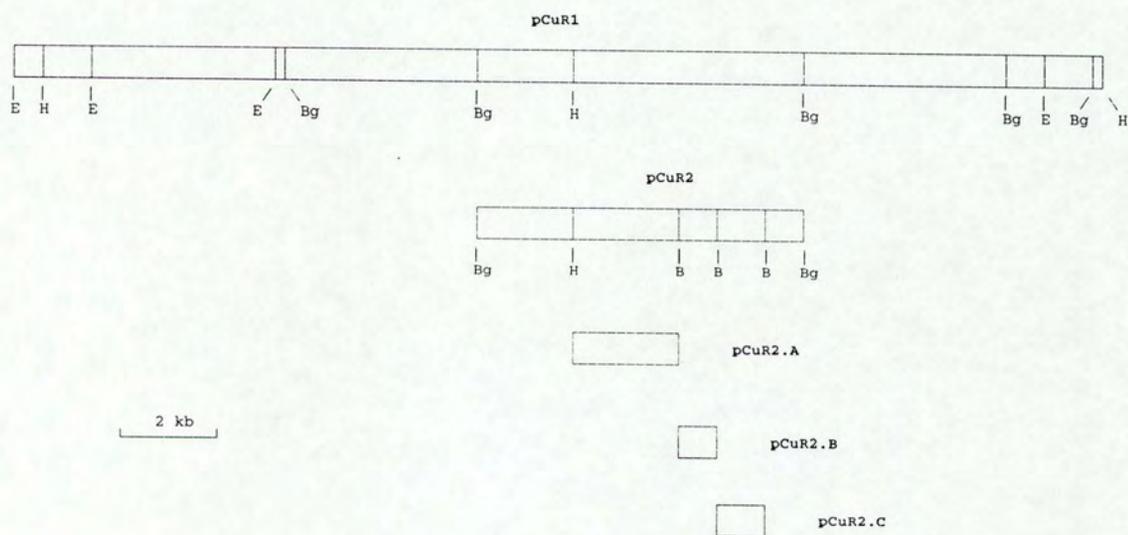
APÊNDICE 1. Concentração de íons de cobre livres no meio CYE em função de diferentes quantidades de CuSO_4 (MENKISSOGLU & LINDOW, 1991b).



APÊNDICE 2. Concentração de íons de cobre nas folhas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck tratadas com CuSO_4 (MENKISSOGLU & LINDOW, 1991a)



APÊNDICE 3. Mapa de restrição do clone plasmidial pCuR1 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* envolvido com resistência ao cobre. As letras indicam as enzimas de restrição; (E) *EcoRI*, (H) *HindIII*, (Bg) *BglIII* e (B) *BamHI* (GARDE & BENDER, 1991).



APÊNDICE 4. Tabela de transformação de probabilidades em probit^a (FINNEY, 1971) ^aA conversão é feita a partir do coeficiente percentual de resposta para probit.

P	0	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
0,1	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
0,2	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
0,3	4,48	4,50	4,52	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69
0,4	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,95
0,5	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
0,6	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
0,7	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
0,8	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
0,9	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
0,9	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
	7,33	7,37	7,41	7,46	7,56	7,58	7,65	7,75	7,88	8,09