



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AGROINDUSTRIAL

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* PELA TÉCNICA DE RAPD E PROGNÓSTICO DA PRODUÇÃO E QUALIDADE DA XANTANA

CRISTIANE TESSMANN

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, pela mestranda Cristiane Tessmann, como requisito ao Grau de Mestre em Ciências, sob a orientação do Professor Dr. Wladimir Padilha da Silva.

PELOTAS
Rio Grande do Sul - Brasil
Março de 2002



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AGROINDUSTRIAL

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* PELA TÉCNICA DE RAPD E PROGNÓSTICO DA PRODUÇÃO E QUALIDADE DA XANTANA

CRISTIANE TESSMANN

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, pela mestranda Cristiane Tessmann, como requisito ao Grau de Mestre em Ciências, sob a orientação do Professor Dr. Wladimir Padilha da Silva.

PELOTAS
Rio Grande do Sul - Brasil
Março de 2002

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

T341c Tessmann, Cristiane

Caracterização molecular de xanthomonas campestris pv. Pruni pela técnica de RAPD e prognóstico da produção e qualidade da xantana / Cristiane Tessmann ; orientador Wladimir Padilha da Silva . – Pelotas, 2002. – 46 f. : il. Dissertação (Mestrado). Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas,. Pelotas, 2002.

1. Xanthomonas campestris pv. pruni 2 Xantana 3. RAPD
I .Silva, Wladimir Padilha da (orientador) II .Título.

CDD 576.1

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* PELA TÉCNICA DE RAPD E PROGNÓSTICO DA PRODUÇÃO E QUALIDADE DA XANTANA

CRISTIANE TESSMANN

BIÓLOGA

APROVADA: MARÇO DE 2002

COMISSÃO ORIENTADORA:

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Profa. Dra. Claire Tondo Vendruscolo

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profa. Dra. Andrea Bittencourt Moura

Profa. Dra. Claire Tondo Vendruscolo

Prof. Odir Antonio Dellagostin, PhD

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva - Orientador

AGRADECIMENTOS

A DEUS pela força.

Aos meus pais pela vida.

Ao Marcelo pela paciência e companheirismo no desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Wladimir Padilha da Silva pela orientação, paciência, confiança e amizade.

À Professora Claire Tondo Vendruscolo pela confiança e incentivo.

À Doutoranda Angelita da Silva Moreira pela co-orientação e amizade, sem as quais não chegaria até aqui.

Ao Professor Odir Antônio Dellagostin por abrir as portas do seu laboratório.

À Eng^a Bilica pela análise de viscosidade.

À Dra. Eliane Augustin por permitir a utilização da centrífuga.

À Dona Maria de Lourdes Hardtke pelo auxílio e colaboração no fornecimento das cepas.

À Patrícia Brites pelo ensinamento, companheirismo, coleguismo e confiança durante esse trabalho.

Aos Amigos do Departamento de Microbiologia e Parasitologia pelo “colo” nas horas de angústia.

Às amigas Adriana Pan e Elizabete pelo auxílio.

Aos colegas do MICROBIAL pela amizade, carinho, incentivo e auxílio em todos os momentos.

Aos professores do PPGCTA pelos ensinamentos.

Aos “Participantes” do Centro de Biotecnologia, pelos momentos agradáveis que me propiciaram.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
Lista de tabelas.....	vii
Lista de figuras.....	viii
Sumário	x
Summary	xii
1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	3
2.1. <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i>	3
2.2. Xantana	8
2.3. RAPD	10
3. Material e Métodos	12
3.1. Cepas bacterianas	12
3.2. Produção da xantana	12
3.3. Viscosidade	14
3.4. Composição química	14
3.5. Extração do DNA	15
3.6. Análise do polimorfismo do DNA por amplificação aleatória ..	15
4. Resultados	16
4.1. Produção	16

4.2. Viscosidade	16
4.3. Composição química	17
4.4. Caracterização molecular.....	19
5. Discussão	22
6. Conclusões	27
7. Referências Bibliográficas	28

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Características distintas de espécies do gênero <i>Xanthomonas</i>	05
Tabela 2 – Características de isolamento de 20 cepas de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i> pertencentes a bacterioteca da EMBRAPA-CPACT.....	13

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Eletromicrografia de transmissão de <i>X. campestris</i>	04
Figura 2 – Sintoma de bacteriose em folhas	07
Figura 3 – Sintoma de bacteriose em fruto	07
Figura 4 – Estrutura do polissacarídeo extracelular de <i>X. campestris</i>	09
Figura 5 – Produção e viscosidade da xantana produzida por 20 cepas de <i>X. campestris</i> pv. <i>pruni</i> em Meio de Produção II.....	17
Figura 6 – Cromatografia em camada delgada comparativa de xantana produzida por 20 cepas de <i>X. campestris</i> pv. <i>pruni</i> . P1: padrões de glicose (G) e ramnose (R); P2: padrões de ácido glicurônico (AG) e manose (M); Xantana comercial (X).....	18
Figura 7 – Triagem dos <i>primers</i> . Eletroforese em gel de agarose 1,5 %. M, ladder 100 pb. 5, 6, 7, 8 e 9, <i>primers</i> 105, 106, 107, 108 e 109, respectivamente. A, Xcp. 43. B, Xcp. 9	19
Figura 8 – RAPD <i>primer</i> 127 (ATC TGG CAG C). Eletroforese em gel de agarose 1,5 %. M, ladder 100 pb. N, controle negativo. X, <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> NRRL-B-1459.	20

Figura 9 – RAPD *primer* 149 (AGC AGC GTG G). Eletroforese em gel de agarose 1,5 %. M, ladder 100 pb. N, controle negativo. X, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL-B-1459. 21

SUMÁRIO

TESSMANN, Cristiane. M.S. Universidade Federal de Pelotas. Abril de 2002. Caracterização molecular de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* pela técnica de RAPD e prognóstico da produção e qualidade da xantana. Wladimir Padilha da Silva.

Diversas cepas de *X. campestris* são capazes de produzir um polímero extracelular denominado xantana, que é amplamente utilizado em alimentos. A xantana utilizada no Brasil é em sua totalidade importada. Entretanto, pela diversidade da microbiota, o país apresenta bom potencial para a produção deste polímero com ótima qualidade industrial. A análise do polimorfismo do DNA por amplificação aleatória (RAPD) apresenta uma série de vantagens práticas quando comparada a outras técnicas moleculares. O objetivo deste estudo foi correlacionar os perfis genéticos gerados pela técnica do RAPD com a planta hospedeira e com a produção, viscosidade e composição química de xantana produzida por 20 cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. Para a análise do RAPD foram utilizados dois *primers*, resultando na amplificação de fragmentos polimórficos, permitindo a diferenciação de cepas. A produção do biopolímero foi feita em MP11, a 28°C e 200 rpm por 72 h. Foi analisada a viscosidade de solução 3% (m/v) de xantana a 25°C no reômetro rotativo HAAKE RS150. A análise da composição química dos biopolímeros foi realizada através de cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC).

A produção da goma xantana variou em função da cepa de *X. campestris* pv. *pruni* produtora. Todos os polímeros produzidos no laboratório apresentaram comportamento pseudoplástico e a mesma composição química: ácido glicurônico, glicose, manose e ramnose. O perfil de RAPD mostrou uma grande similaridade genética entre as cepas estudadas. Com os *primers* testados, não houve correlação entre os resultados de RAPD X produção X viscosidade X composição química. Observou-se, porém, diferença entre o perfil genético do isolado de amendoeira e isolados de pessegueiro e ameixeira.

SUMMARY

Tessmann, Cristiane. M.S. Universidade Federal de Pelotas, April 2002, Molecular characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* by RAPD technique and relationship with the production and quality of xanthan gum. Wladimir Padilha da Silva.

Several *Xanthomonas campestris* strains are able to produce an extracellular biopolymer called xanthan gum, that has been used in a wide variety of foods. The xanthan used in Brazil is, in its totality, imported. However, the Brazilian microbiota is very rich, presenting good potential for the production of this polymer. The random amplified polymorphic DNA technique (RAPD) presents a series of practical advantages when compared with others DNA techniques. The objective of this work was to correlate the genetic profile produced by RAPD technique with host, yield, viscosity and chemical composition of the biopolymers synthesized by 20 strains of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. For RAPD analysis, two primers were utilized, resulting in polymorphic amplified fragments, allowing the strains to be differentiated. The fermentation was done in PMII, at 28°C and 200 rpm for 72 h and the viscosity of the aqueous solution at 3% was analyzed at 25°C in HAAKE RS150 rheometer. For analysis of chemical composition the comparative thin layer chromatography was used. Xanthan yield in PMII medium were not uniform and varied according with the *X. campestris* pv. *pruni* strain. All the biopolymers showed pseudoplastic

behavior and all the strains studied had mannose, glucose and glucuronic acid. The RAPD profile showed a large similarity among the strains. With the tested primers, it was not possible to correlate RAPD X yield X viscosity X chemical composition. It was observed difference between the genetic profile of a strain from almond tree and strains from plum and peach trees.

1. INTRODUÇÃO

Xanthomonas campestris pv. *pruni* são bactérias fitopatogênicas de ocorrência natural, aeróbicas estritas, Gram-negativas, com células exibindo morfologia de bastonetes curtos e delgados. Infecta naturalmente vegetais do gênero *Prunus* e híbridos, incluindo pessegueiro, cerejeira e ameixeira, entre outros, sendo responsável pela doença denominada “Prunus Bacterial Spot” (PBS) (Bradbury, 1994). Durante o seu cultivo apresenta a capacidade de produzir a goma xantana, um heteropolissacarídeo poliânico, solúvel em água quente ou fria e de elevado peso molecular (Roitman *et al.*, 1987). A xantana é um polímero secretado no meio de cultura (exopolímero) e formado por glicose, manose e ácido glicurônico (Sutherland, 1982). Suas propriedades químicas e de viscosidade, principalmente a grande estabilidade em relação a variações de pH e temperatura, fazem com que este polissacarídeo seja amplamente utilizado na indústria alimentícia, como espessante e estabilizante de suspensões e emulsões.

Industrialmente, existe um aumento na demanda por biopolímeros como substituintes parciais de polissacarídeos clássicos, tanto por suas propriedades funcionais únicas, quanto por serem sintetizados em tempo mais curto.

A xantana utilizada no Brasil é importada, em quase sua totalidade. Entretanto, pela diversidade da microbiota contendo bactérias do gênero *Xanthomonas*, o país apresenta bom potencial para a produção de xantanas de ótima qualidade industrial, tornando-se importante caracterizar e selecionar as cepas que apresentem melhor produtividade e/ou sintetizem gomas com melhor qualidade.

A espécie *X. campestris* tem sido dividida em mais de 140 patovares (Berthier et al., 1993). Uma caracterização mais detalhada da variabilidade genética entre cepas de *Xanthomonas* não tem sido registrada, apesar da importância econômica deste gênero bacteriano. Entretanto, para complementar os testes fisiológicos, existem vários métodos rápidos usados para identificar bactérias, incluindo testes sorológicos, perfil de ácidos graxos e RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism") genômico e plasmidial (Pooler et al., 1996).

Análises de DNA genômico que utilizam métodos baseados na reação de polimerase em cadeia (PCR – "Polymerase Chain Reaction") têm demonstrado serem rápidas, sensíveis e seguras para determinar relações entre organismos patogênicos. Dentre estas, destaca-se a análise do polimorfismo do DNA por amplificação aleatória (RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA) que é um método de tipagem molecular menos trabalhoso e realizado em menor tempo quando comparado a outras técnicas moleculares, e que pode ser aplicado para uma rápida identificação (Arias et al., 1998). O RAPD permite a detecção de diferenças entre grupos de cepas muito similares e gera padrões únicos, os quais podem ser úteis na caracterização e diferenciação de cepas, bem como no diagnóstico de doenças (Ferreira et al., 1997). A tipagem por esta técnica é mais completa em situações nas quais um grande número de cepas está sendo avaliado (Campbell et al., 2000).

Considerando-se o exposto acima, objetivou-se caracterizar molecularmente 20 cepas de *X. campestris* pv. *pruni* e relacionar com a produção, viscosidade e composição da xantana, visando selecionar as cepas que apresentem a melhor relação quantidade/qualidade da goma sintetizada. Também objetivou-se estabelecer correlação entre os perfis genéticos obtidos e a origem (planta hospedeira) da cepa.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*

Bactérias pertencentes ao gênero *Xanthomonas* (do grego, “xanthus” = amarelo, “monas” = unidade) são bacilos Gram negativos, medindo 0,4 – 07 x 0,7 – 1,8 μm (FIGURA 1). São móveis por meio de um único flagelo polar, aeróbicos estritos, possuindo um tipo preciso de metabolismo respiratório com O_2 comoceptor final de elétrons. A temperatura ótima de crescimento situa-se entre 25 e 30 °C e as colônias normalmente são amarelas e lisas, butirosas ou viscosas. Caracteristicamente, produzem um pigmento amarelo, insolúvel em água, denominado xantomonadina (aril-polieno-brominado) (Bradbury, 1994).

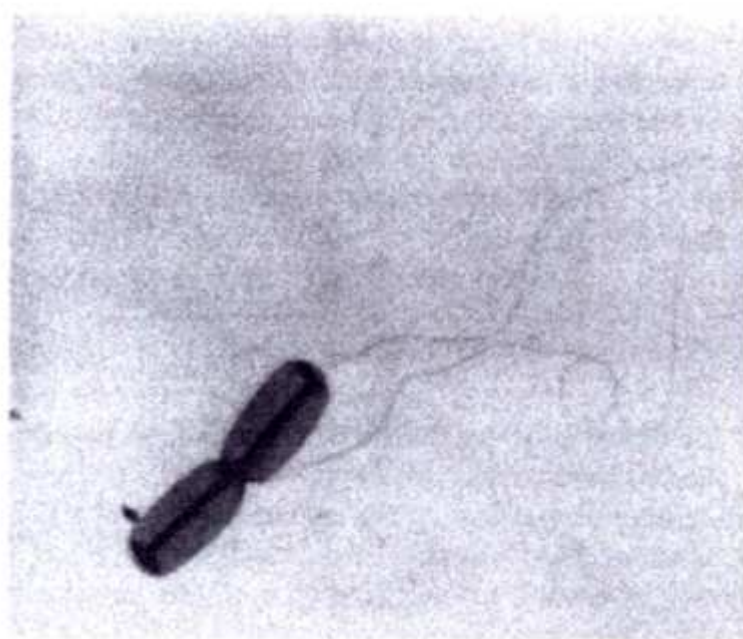


FIGURA 1 – Eletromicrografia de transmissão de *X. campestris* (x 12.000) (García-Ochoa et al., 2000).

Quase todos os membros do gênero *Xanthomonas* são encontrados em plantas de praticamente todo o mundo (Bradbury, 1994). Causam lesões necróticas em folhas, caules e frutos, murchas, maceração de tecidos (raízes), e hiperplasias (como cancro cítrico) em pelo menos 124 espécies de monocotiledôneas e 268 espécies de dicotiledôneas, incluindo importantes espécies de valor comercial como arroz, feijão, mandioca, algodão, tomate, trigo, crucíferas e cítricos (Leyns et al., 1984). Cinco espécies de *Xanthomonas* já foram descritas (TABELA 1) e, entre elas, *X. campestris*, que é a espécie mais complexa e está subdividida em mais de 140 patovares (Bradbury, 1994), os quais diferem na especificidade ao hospedeiro e ao tecido infectado.

TABELA 1 – Características distintas de espécies do gênero *Xanthomonas*

Características	<i>X. campestris</i>	<i>X. fragariae</i>	<i>X. albilineans</i>	<i>X. axonopodis</i>	<i>X. ampelina</i>	" <i>X. populi</i> "*
Crescimento mucóide em ágar nutriente + 5% de glicose	+	+	-	-	-	+
Produção de xantomonadina	+	+	+	+	- ^a	
Hidrólise de gelatina	d	+	d	-	-	-
esculina	+	-	+	+	-	
amido	d	+	-	+	-	
Proteólise do leite	+	-	-	-	-	tardio
H ₂ S a partir da peptona	+	-	-	+	d	-
Atividade da urease	-	-	-	-	+	-
Temperatura máxima de crescimento (°C)	35-39	33	37	35-37	30	27,5
Tolerância máxima a NaCl (%)	2,0-5,0	0,5-1,0	0,5	1,0	1,0	0,4-0,6
Produção de ácido a partir de						
arabinose	+	-	-	-	+	-
glicose,	+	+	+	+	-	+
sacarose						
manose	+	+	+	-	-	+
galactose	+	-	d	-	+	+
trealose	+	-	-	+	-	+
celobiose	+	-	-	-	-	-
frutose	+	+	-	-	-	+

+ 90% ou mais amostras são positivas.

- 90% ou mais amostras são negativas.

d 11-89% das amostras são positivas.

^a os pigmentos de *X. ampelina* têm espectro de absorção diferente das outras xantomonadinas e, provavelmente, não são xantomonadinas.

* esta espécie parece se ajustar a definição do gênero, embora não se saiba se xantomonadinas são produzidas.

Fonte: Bradbury, 1994

Uma nova classificação para o gênero *Xanthomonas* com base em estudos de comparação das seqüências de oligonucleotídeos do ácido nucléico

ribossomal (rRNA) ou das seqüências dos genes correspondentes, e de homologia quantitativa de DNA expressa em níveis de hibridização do DNA total da célula foi proposta, dividindo este gênero em 20 espécies: *X. albilineans*, *X. arboricola*, *X. axonopodis*, *X. bromi*, *X. campestris*, *X. cassavae*, *X. codiae*, *X. cucurbitae*, *X. fragariae*, *X. hortorum*, *X. hyacinthi*, *X. melonis*, *X. oryzae*, *X. pisi*, *X. populi*, *X. sacchari*, *X. theicola*, *X. translucens*, *X. vasicola* e *X. vesicatoria* (Takatsu, 2000). O patovar *X. campestris* pv. *pruni*, através da nova proposta taxonômica, passa a ser *X. arboricola* pv. *pruni*.

A maioria das bactérias pertencentes ao gênero *Xanthomonas* são fitopatogênicas (Bradbury, 1994). Muitas entram na planta através de estômatos ou ferimentos, multiplicam-se nos espaços intercelulares, dentro dos tecidos mesofílicos e parenquimatosos das folhas e frutos, e causam manchas encharcadas, as quais, mais tarde, delimitarão lesões necróticas. Algumas *Xanthomonas*, tais como *X. campestris* pv. *campestris*, entram via hidatódios e, primariamente, colonizam vasos do xilema, invadindo, na patogênese, tecidos circundantes (Denny, 1995).

Diversos fatores estão envolvidos na interação de bactérias fitopatogênicas com plantas. São exemplos: a produção de enzimas extracelulares, produção de exopolissacarídeos, produção de substâncias químicas (toxinas e hormônios), fatores físicos (temperatura, luz, umidade, etc.) e produtos de alguns genes da planta e do patógeno (Daniels *et al.*, 1984; Alippi, 1992; Agrios, 1988).

A função dos polissacarídeos produzidos por bactérias ainda não está bem esclarecida. Em *Xanthomonas*, por exemplo, a relação da produção da goma xantana (exopolissacarídeo produzido por este gênero) e patogenicidade ainda não é bem entendida (Barrère *et al.*, 1986; Daniels *et al.*, 1988; Ramirez *et al.*, 1988). Para outro gênero de bactérias fitopatogênicas, *Pseudomonas*, o exopolissacarídeo (EPS) parece ser importante na patogenicidade. Para algumas espécies deste gênero já foi demonstrado que EPS purificado induz alguns sintomas da doença (Kao *et al.*, 1992).

A doença denominada Mancha Bacteriana em *Prunus* (*Prunus* bacterial spot - PBS) foi descrita pela primeira vez em 1902 na América do Norte (Bradbury, 1994). O agente causal é *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* e afeta a grande maioria das cultivares comerciais de várias espécies de *Prunus*, tais

como damasco (*P. armeniaca*), cereja (*P. avium*), amêndoa (*P. amygdalus*), pêsego e nectarina (*P. persica* e *P. persica* var. *nectarina*), ameixa européia (*P. domestica*) e ameixa japonesa (*P. salicina*), entre outras. A doença ocorre na maioria dos países onde frutas com caroço são cultivadas (Civerolo & Hattingh, 1993).

Perdas econômicas diretas devido ao PBS resultam numa redução no mercado de frutas, com desagradáveis manchas escuras (FIGURAS 2 e 3). A colheita inteira pode ser afetada quando condições favorecem a infecção e o desenvolvimento da doença (Civerolo & Hattingh, 1993).



FIGURA 2 – Sintoma de bacteriose em folhas (Fortes & Martins, 1998).

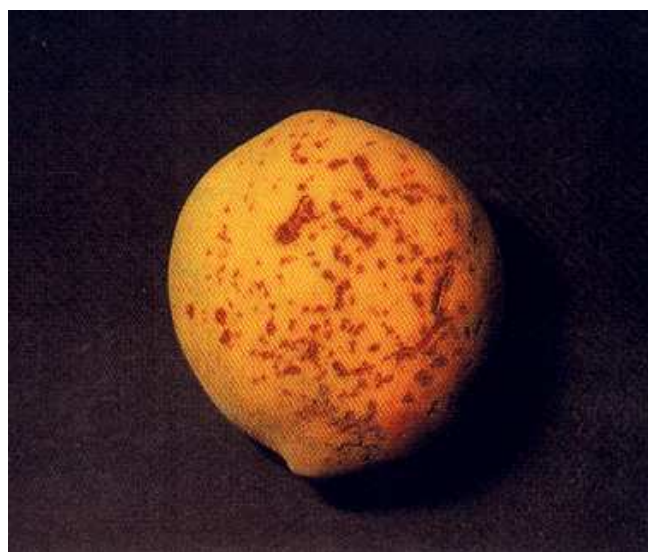


FIGURA 3 – Sintoma de bacteriose em fruto (Fortes & Martins, 1998).

2.2. Xantana

A goma xantana é um polissacarídeo natural e um importante biopolímero industrial. Foi descoberto em 1950, no Laboratório Regional de Pesquisas do Norte (NRRL) do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (Margaritis & Zajic, 1978). Extensas pesquisas foram realizadas em vários laboratórios industriais durante a década de 60, culminando numa produção semi-comercial denominado de Kelzan® pela Kelco®. A produção comercial começou em 1964 e, hoje, os maiores produtores são Merck e Pfizer nos EUA, Rhône Poulenc e Sanofi-Elf na França e Jungbunzlaner na Áustria (García-Ochoa *et al.*, 2000).

A xantana é um polissacarídeo aniônico, extracelular, de alto peso molecular, produzido durante o processo de fermentação aeróbica de culturas puras de *Xanthomonas campestris* em meio líquido (Lilly, 1958). Quimicamente é formada pelos monossacarídeos *D*-manose, *D*-glucose e ácido *D*-glucurônico. Há, ainda, na molécula, ácido pirúvico e acetila (Milas *et al.*, 1986) (FIGURA 4).

A principal característica exibida por esta goma é sua habilidade para modificar a reologia (ciência que estuda o comportamento dos fluidos em escoamento) ou o comportamento de fluxo das soluções (Margaritis & Pace, 1985). Suas propriedades são determinadas por sua composição química, arranjo e ligação molecular, peso molecular e distribuição (Pace, 1987). O número de unidades de piruvato na molécula e o peso molecular determinam a viscosidade da goma que se forma (Crueger & Crueger, 1993).

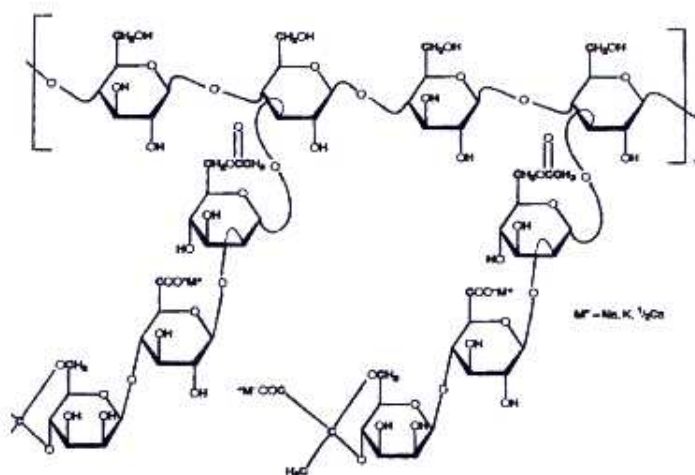


FIGURA 4 – Estrutura do polissacarídeo extracelular de *X. campestris* (García-Ochoa et al., 2000).

Para determinar a qualidade do biopolímero produzido é necessário avaliar seu comportamento reológico. Nitschke & Thomas (1995), apontaram que a reologia é apropriada para triagem de cepas de *X. campestris* para fins industriais, sendo bom indicador da qualidade das gomas. Entretanto, numerosos estudos têm mostrado que diferenças entre as cepas e entre as condições de cultura, podem produzir polímeros com diferentes composições (Sutherland, 1983).

A xantana apresenta propriedades como a formação de soluções viscosas pseudoplásticas e géis (quando em associação com outros polímeros, como as galactomanas) em meio aquoso, mesmo em baixas concentrações, mantendo estas características numa ampla faixa de pH e temperatura, além de compatibilidade com sais minerais (Cottrell, 1979). Segundo Jeanes (1974) e Betz (1979), estas propriedades reológicas a tornam um excelente agente estabilizante para alimentos, como sucos artificiais, sobremesas enlatadas ou em pó, molhos para saladas, carne, frango ou peixe, assim como para xaropes e coberturas para sorvetes e sobremesas. A compatibilidade deste polissacarídeo com a maioria dos colóides usados em alimentos, incluindo o amido, torna-o ideal para as preparações de pães e outros produtos para panificação (Christianson et al., 1974). O Food and Drug Administration (FDA) permite sua adição em produtos como queijos e seus derivados, sobremesas congeladas, alguns produtos a base de leite, molhos especiais para saladas,

molhos de tomates, produtos cárneos e seus derivados, produtos de panificação, sobremesas formuladas com amido, bebidas dietéticas, sorvetes com baixa caloria, entre outros (Pettitt, 1982).

Outro grande consumidor de goma xantana é a indústria farmacêutica, onde fornece excelente estabilidade para cremes e loções, melhora as propriedades dos xampus e de sabonetes líquidos, suspende pigmentos insolúveis e produz um creme de limpeza estável (Baird & Pettitt, 1991; Dziezak, 1991), através de sua capacidade de estabilizar suspensões.

A boa estabilidade em soluções de ácido e de base fortes permite que seja usada como espessante em produtos de limpeza industrial, em banhos de metais e aplicações similares. A excelente propriedade de suspensão é muito útil em pulverizações agrícolas, em processos de fundição, em emulsões de látex, em lubrificantes e em outros produtos contendo líquidos e sólidos insolúveis. A tolerância a ampla faixa de temperatura, a reologia e a estabilidade em soluções salinas são propriedades requeridas para aplicações nas indústrias de petróleo e de explosivos. É também utilizada como agente espessante no processo de tingimento de tecidos e em indústria de defensivos e outros produtos agrícolas (Sutherland, 1993).

De acordo com Kennedy *et al.* (1982), a goma xantana tem sido utilizada extensivamente pela indústria petrolífera, na perfuração de novos poços e na recuperação secundária do petróleo. O seu uso em associação com a lama de perfuração e no fraturamento hidráulico tem resultado num processo de menor custo e maior eficiência para a indústria petroquímica.

2.3. RAPD

A tecnologia da reação de polimerase em cadeia ("PCR – Polymerase Chain Reaction") foi concebida por Kary Mullis em meados da década de 80. Um dos aspectos mais fundamentais da revolução causada pela PCR foi a possibilidade de se gerar grandes quantidades de DNA de segmentos específicos do genoma. Desta maneira, o DNA pode ser facilmente detectado a olho nu diretamente em gel de eletroforese através da utilização de corantes específicos (por exemplo, brometo de etídeo) (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Um grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu em 1990, com a idéia de se utilizar *primers* mais curtos e de seqüência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando assim a necessidade do conhecimento prévio do genoma bacteriano (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Esta técnica, denominada RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA"), DNA polimórfico amplificado ao acaso, foi desenvolvida por Williams *et al.* (1990) nos Estados Unidos. O mesmo método, com pequenas variações no comprimento e concentração do *primer* usado na amplificação mediada pela DNA polimerase e na detecção dos fragmentos, foi também originalmente descrito com as denominações AP-PCR (Arbitrarily Primed – Polimerase Chain Reaction (Welsh & McClelland, 1990)) e DAF (DNA Amplification Fingerprinting (Caetano-Anóles *et al.*, 1991)).

A natureza molecular do polimorfismo RAPD não é inteiramente conhecida. Sabe-se, porém, que a reação RAPD favorece a amplificação de segmentos onde a complementariedade entre o *primer* e o sítio de iniciação no DNA-molde é mais alta (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O RAPD é uma técnica simples e rápida, que não requer compostos radioativos e utiliza quantidades muito pequenas de DNA, o qual não necessita ser altamente puro (Wang *et al.*, 1993). Além disso, a possibilidade de investigar polimorfismos moleculares no DNA sem a necessidade restritiva do sequenciamento, juntamente com o baixo custo para sua execução, constituem as maiores vantagens do RAPD (Ferreira & Grattapaglia, 1998). A presença ou ausência de uma banda de DNA amplificado é a base sobre a qual o polimorfismo é determinado. Este ensaio, entretanto, tem uma dependência absoluta da habilidade de um único *primer* localizar e se ligar no sítio alvo do genoma. Além disso, como desvantagem deve-se destacar a baixa reprodutibilidade que está associada a diversos fatores, tais como método de extração do DNA, concentração e estrutura do DNA, fonte de síntese do *primer*, proporção *primer*:alvo, concentração de íons magnésio, fonte e concentração da DNA polimerase, etc (Destro, 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cepas bacterianas

As cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* (TABELA 2) foram obtidas da bacterioteca da EMBRAPA-CPACT, Pelotas, RS.

3.2. Produção da Xantana

Para a obtenção de culturas recentes, as cepas foram repicadas em meio SPA (Sucrose Peptone Agar) (Hayward, 1964) e incubadas a 28 °C por 24 horas. Após, uma alçada foi transferida para tubo de ensaio com 1 mL de meio líquido YM (Yeast Malt) (Jeanes, 1974) e homogeneizada em agitador de tubos para obter-se densidade celular de 10^9 mL^{-1} . A suspensão resultante foi inoculada em erlenmeyer, contendo 6 mL de meio líquido YM e incubada em agitador, a 28 °C por 24 horas a 180 rpm. Após o período de multiplicação das células, cada cepa, com três repetições, foi transferida para erlenmeyer contendo 45 mL de MP-II (Meio de Produção II) (Cadmus *et al.*, 1978) e incubado a 28 °C por 72 horas a 200 rpm (Souza & Vendruscolo, 1999).

Tabela 2 – Características de isolamento de 20 cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* pertencentes a bacterioteca da EMBRAPA-CPACT

Cepa	Hospedeiro	Local de Procedência	Data de Isolamento
Xcp. 02	Folha de ameixeira	Vacaria/RS	30/01/90
Xcp. 03	Folha de pessegueiro	Pelotas/RS	18/03/90
Xcp. 04	Folha de pessegueiro	Canguçu/RS	16/11/90
Xcp. 11	Folha de pessegueiro	Morro Redondo/RS	15/09/90
Xcp. 13	Fruto de ameixeira	Vacaria/RS	11/02/90
Xcp. 17	Folha de ameixeira	Vacaria/RS	16/11/90
Xcp. 22	Fruto de ameixeira	Vacaria/RS	16/11/90
Xcp. 29	Folha de pessegueiro	Vacaria/RS	16/11/90
Xcp. 33	Folha de ameixeira	Vacaria/RS	16/11/90
Xcp. 34	Folha de ameixeira	Vacaria/RS	16/11/90
Xcp. 43	Folha de ameixeira	São Paulo/SP	11/01/91
Xcp. 47	Fruto de ameixeira	Vacaria/RS	09/01/91
Xcp. 48	Fruto de ameixeira	Vacaria/RS	09/01/91
Xcp. 49	Folha de amendoeira	Pelotas/RS	23/01/91
Xcp. 66	Folha de pessegueiro	Piratini/RS	04/11/91
Xcp. 68	Fruto de ameixeira	Pelotas/RS	desconhecida
Xcp. 85	Fruto de pessegueiro	Pelotas/RS	22/11/94
Xcp. 86	Fruto de pessegueiro	Pelotas/RS	29/09/95
Xcp. 90	Fruto de ameixeira	Pelotas/RS	08/12/00
Xcp. 91	Folha de pessegueiro	Piratini/RS	06/12/00

Ao término do processo, o fermentado foi centrifugado a 10 °C e 10.000 rpm por 35 minutos para remoção da biomassa (Vendruscolo, 1995). Ao sobrenadante, foi adicionado, na proporção de 3:1 (v/v), etanol a 96 °GL para a insolubilização dos biopolímeros, os quais foram recolhidos em placas de Petri, secos em estufas a 40 °C até peso constante e triturados. Foi, então, determinada a massa dos biopolímeros secos e calculada a concentração em g.L⁻¹ de meio empregado, decorrente da média das três repetições.

3.3. Viscosidade

As amostras de xantana das 20 cepas foram preparadas em solução aquosa a 3 % (m/v) e as medidas de viscosidade foram realizadas no reômetro rotativo RS150 (HAAKE), com sensor placa cone PP35TI, a 25 °C. O tempo de análise foi de 300 s e a taxa de deformação variou entre 0,01 a 60 s⁻¹.

3.4. Composição Química

Alíquotas de 0,15 g das xantanas produzidas foram hidrolisadas em ácido clorídrico 2 N a 85 °C por 16 horas, segundo a metodologia de Moreira *et al.* (1998). Os componentes do hidrolisado foram identificados por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC), aplicando-se 3 µL em placas flexíveis de alumínio (cromatofolhas) de gel de sílica 60 F₂₅₄ (Merck), em cuba pré-equilibrada com o eluente constituído de clorofórmio:metanol:água:ácido acético, nas proporções volumétricas de 40:40:10:10 (Moreira *et al.*, 1998). A revelação dos cromatogramas foi com reagente de detecção anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 200 °C com pistola (Master Heat Gun), durante 2 minutos (Churms, 1982).

Para fins comparativos, foram utilizadas amostras padrão de glicose (Merck) e ramnose (Merck) (P10) e ácido glicurônico (Merck) e manose (Merck) (P2), bem como o hidrolisado da xantana comercial (Kelko® Kelgum 87).

3.5. Extração do DNA

As bactérias foram cultivadas em caldo YM modificado (7 g de extrato de levedura (Merck), 7 g de extrato de malte (Merck), 17 g de peptona (Merck), 10 g de glicose (Merck), 1 L de água destilada) e incubadas a 28 °C por 24 horas a 180 rpm. Transcorrido este tempo, foi utilizado o kit de extração de DNA Puregene (Gentra Systems), conforme as instruções do fabricante.

3.6. Análise do polimorfismo do DNA por amplificação aleatória

Para a amplificação do DNA cromossômico foi utilizada a técnica de Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) testando-se 50 *primers* de sequência arbitrária sintetizados pelo Projeto de Oligonucleotídeos Set 100/2 da University of British Columbia. Foi realizada uma triagem desses *primers* para avaliação e seleção daqueles que apresentassem maior polimorfismo genético entre as cepas, de forma a permitir uma melhor avaliação da diversidade genética.

O ensaio foi realizado em um termociclador Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer), com o seguinte programa: 94 °C/5 min, seguido de 40 ciclos de 94 °C/1 min, 33 °C/1,5 min e 72 °C/2 min, com uma extensão final de 72 °C/7 min.

Cada reação, num volume total de 25 µL, constava de 2 mM de *primer* (10-Mers Set 1002 – UBC), 10 X tampão *Taq* (CenbiotecPOA), 1,5 mM de MgCl₂ (CenbiotecPOA), 0,2 mM de cada dNTP (Amersham Pharmacia Biotech Inc), 1 U da enzima *Taq* DNA polimerase (CenbiotecPOA) e 0,1 µg de DNA bacteriano. Um controle negativo sem DNA bacteriano também foi incluído no ensaio. O produto de cada reação foi analisado em gel de agarose (Baker Analyzed) 1,5 % e comparado com Ladder 100 pb (Gibco BRL®).

4. RESULTADOS

4.1. Produção

A produção da goma xantana variou em função da cepa de *X. campestris* pv. *pruni* produtora, como pode ser observado na figura 5, não podendo-se estabelecer uma relação entre produção e hospedeiro.

4.2. Viscosidade

O resultado da viscosidade pode ser observado na figura 5. Os biopolímeros produzidos pelas cepas 02, 43 e 90 apresentaram viscosidades similares ao descrito para a xantana comercial (aproximadamente 26 Pa.s^{-1} , segundo Moreira *et al.*, 2001). Os biopolímeros produzidos pelas cepas 49 e 68 apresentaram viscosidades inferiores à xantana comercial. Já as viscosidades dos demais biopolímeros foram superiores à xantana comercial.

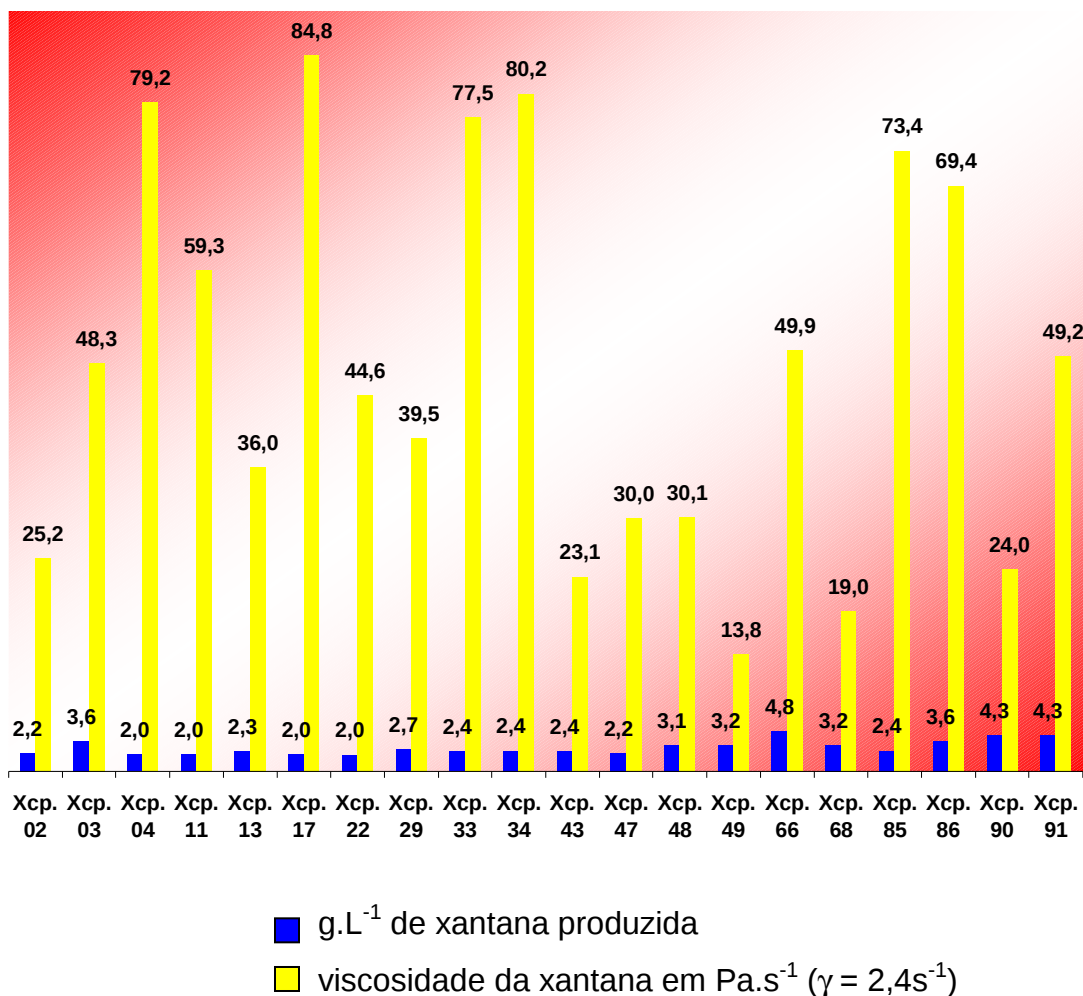


FIGURA 5 - Produção e Viscosidade da xantana produzida por 20 cepas de *X. campestris* pv. *pruni* em Meio de Produção II.

4.3. Composição Química

Como mostrado na figura 6, todos os polímeros produzidos apresentaram a mesma composição química: ácido glicurônico, glicose, manose e ramnose. Entretanto, houve diferença de intensidade e tamanho nas manchas dos cromatogramas, sugerindo quantidades variáveis de seus componentes. Podem, ainda, ser visualizadas outras manchas nos cromatogramas, que constituem-se em artefatos da técnica de hidrólise.

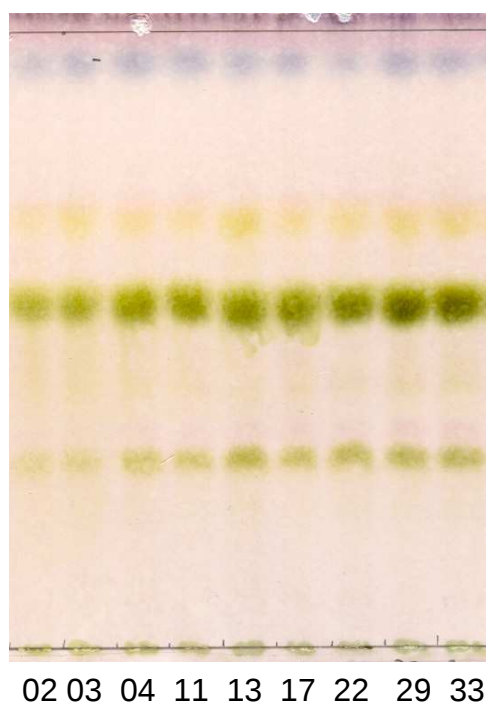
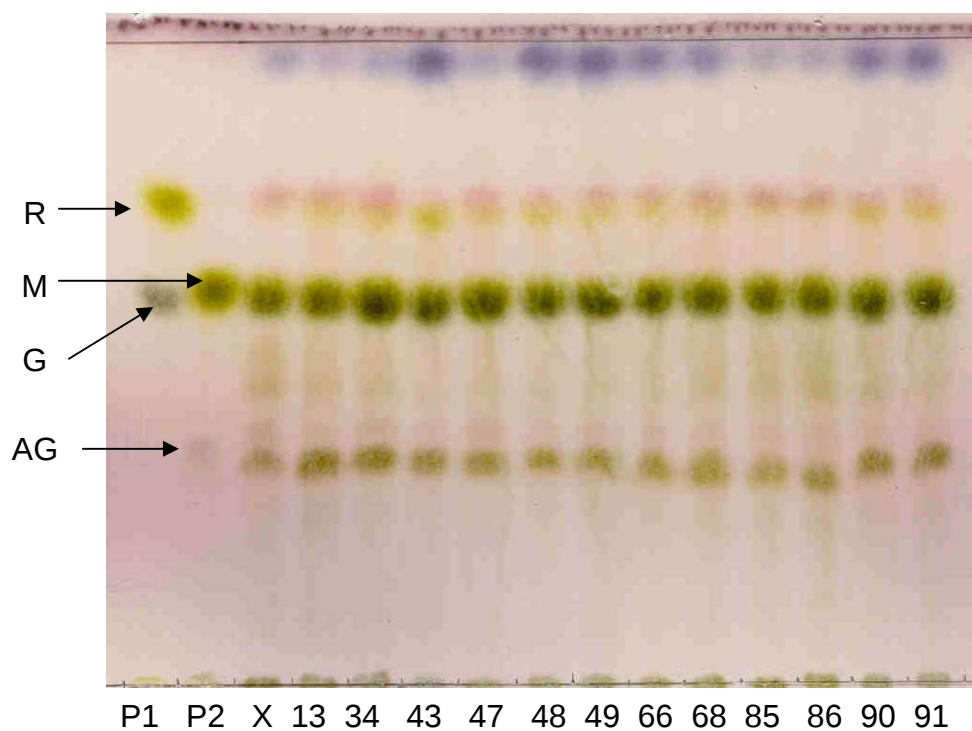


FIGURA 6 - Cromatografia em camada delgada comparativa de xantana produzida por 20 cepas de *X. campestris* pv. *pruni*. P1: padrões de glicose (G) e ramnose (R); P2: padrões de ácido glicurônico (AG) e manose (M); Xantana comercial (X).

4.4. Caracterização Molecular

Para a técnica do RAPD tornou-se necessário realizar uma triagem entre 50 *primers* pertencentes ao kit sintetizado pelo Projeto de Oligonucleotídeos Set 100/2 da University of British Columbia UBC, selecionando os que detectassem maior polimorfismo genético. Um exemplo desta triagem é mostrado na figura 7, onde pode-se observar que as duas cepas testadas (Xcp. 43 e Xcp. 90) não apresentaram polimorfismo quando amplificadas com os *primers* 105, 106, 107, 108 e 109.

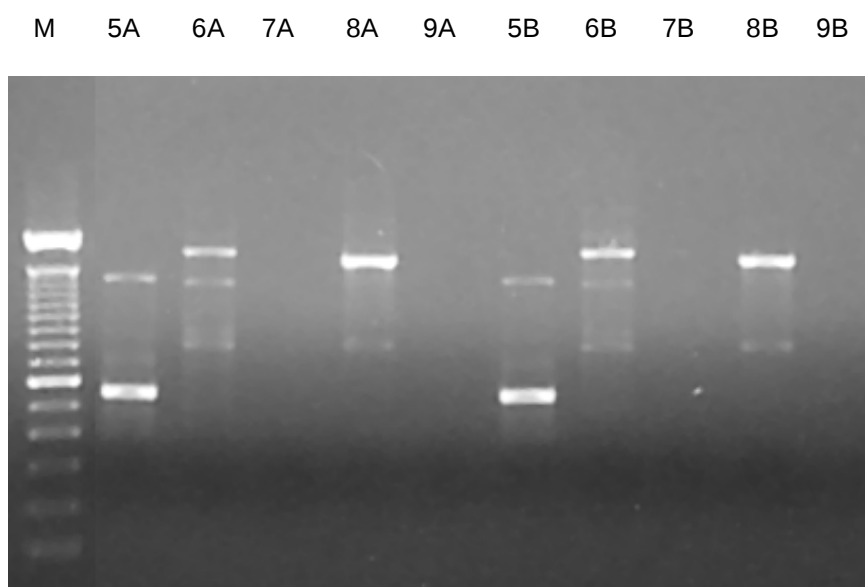


Figura 7 – Triagem dos *primers*. Eletroforese em gel de agarose 1,5%. M, ladder 100pb. 5, 6, 7, 8 e 9, *primers* 105, 106, 107, 108 e 109, respectivamente. A, Xcp. 43. B, Xcp. 90.

Nas figuras 8 e 9 observa-se o resultado da amplificação das cepas de *X. campestris* pv. *pruni* com os *primers* 127 (ATC TGG CAG C) e 149 (AGC AGC GTG G), que foram os que detectaram polimorfismo genético entre as cepas.

Com o *primer* 127 (figura 8), obteve-se quatro padrões diferentes, os quais podem ser agrupados da seguinte maneira: grupo 1, formado pelas cepas 02, 17, 22, 29, 47 e 90; grupo 2, formado pelas cepas 03, 04, 11, 19, 33, 34, 48, 66, 86 e 91; grupo 3, formado pelas cepas 43, 68 e 85 e grupo 4, formado pela cepa 49.

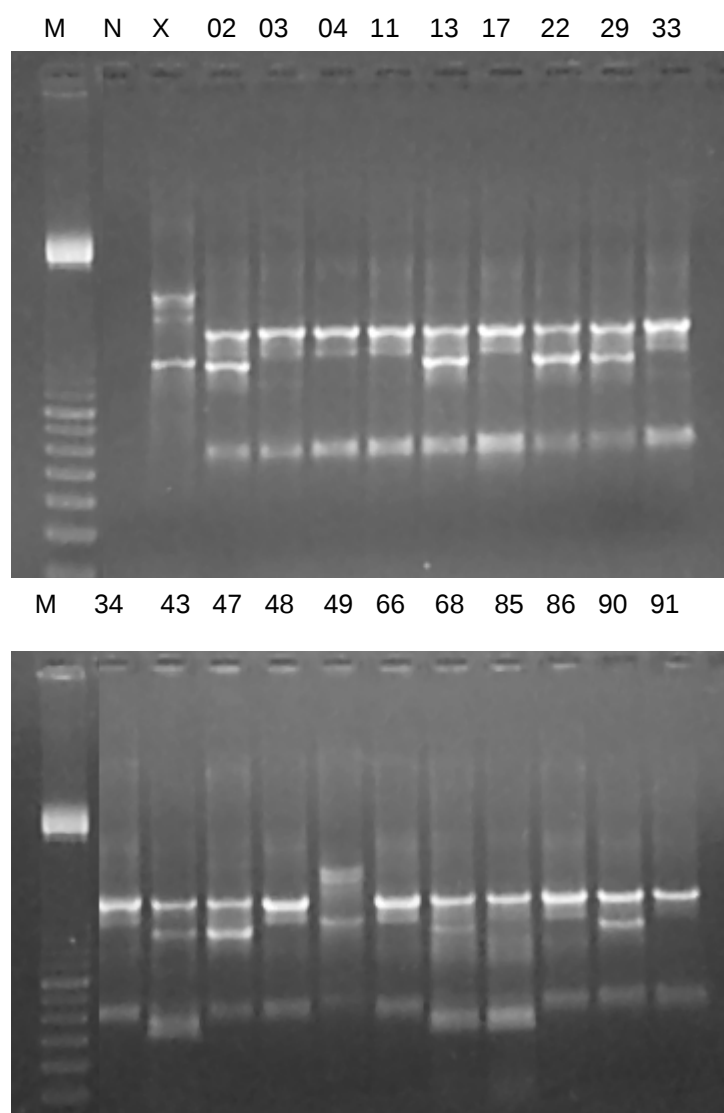


Figura 8 - RAPD *primer* 127 (ATC TGG CAG C). Eletroforese em gel de agarose 1,5 %. M, ladder 100 pb. N, controle negativo. X, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL-B-1459.

Com o *primer* 149 (figura 9), obteve-se quatro padrões diferentes, os quais podem ser agrupados da seguinte maneira: grupo 1, formado pelas cepas 02, 03, 17, 22, 29, 43, 68, 85 e 90; grupo 2, formado pelas cepas 04, 11, 19, 33, 34, 48, 66, 47 e 91; grupo 3, formado pelas cepas 49 e grupo 4, formado pela cepa 86.

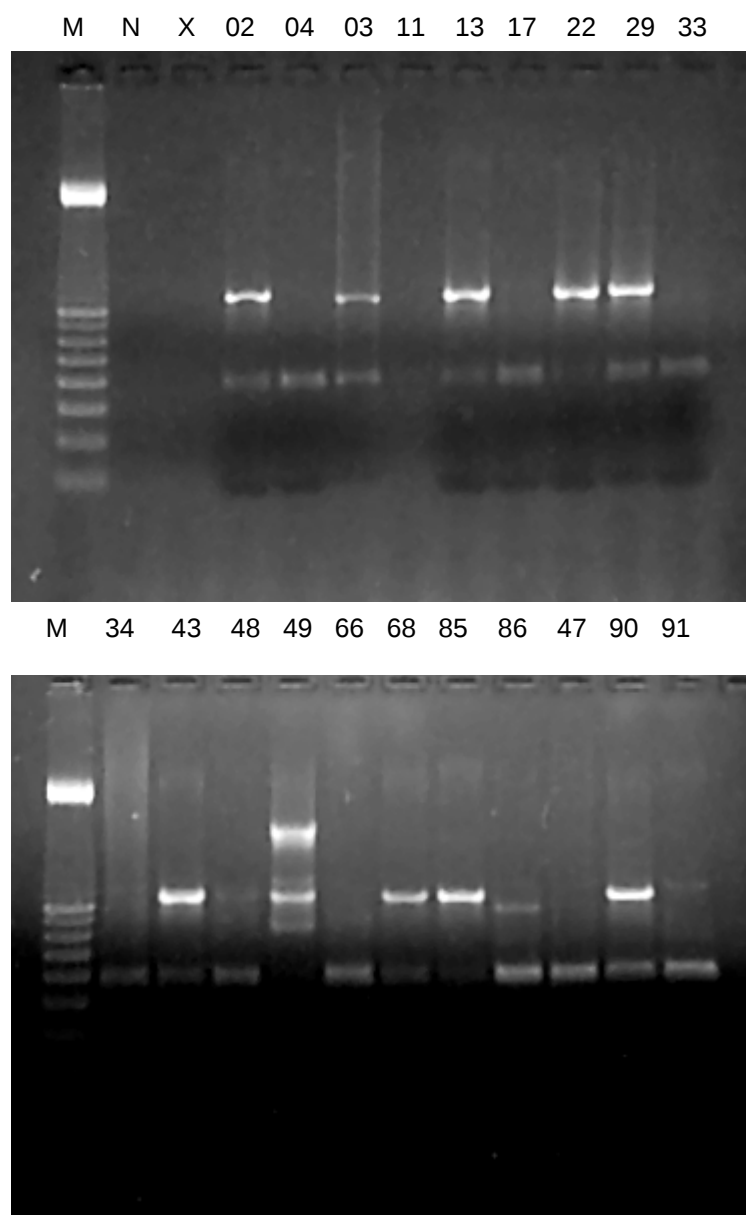


Figura 9 - RAPD *primer* 149 (AGC AGC GTG G). Eletroforese em gel de agarose 1,5 %. M, ladder 100 pb. N, controle negativo. X, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL-B-1459.

5. DISCUSSÃO

Antunes (2000), utilizando uma cepa de *X. campestris* pv. *pruni*, produziu 20,1 g.L⁻¹ de xantana em MP11. Souza & Vendruscolo (1999), que utilizaram as cepas 24 e 58 de *X. campestris* pv. *pruni*, também da bacterioteca da EMBRAPA-CPACT, obtiveram 11,8 e 10,2 g.L⁻¹ de xantana em MP11, respectivamente. Nitschke & Rodrigues (2000) produziram 13,5 e 11,7 g.Kg⁻¹ de xantana em um meio de produção segundo Ramirez *et al.* (1988), com cepas de *X. campestris* isoladas de brócolis e couve-flor, respectivamente. Os mesmos autores também produziram 13,3 g.Kg⁻¹ de xantana com a cepa de *X. campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 (cepa padrão). Assim, os resultados de produção de xantana demonstraram que são cepa dependentes.

Todas as amostras de xantana produzidas no laboratório, independente da cepa, apresentaram comportamento pseudoplástico, ou seja, com o aumento da taxa de deformação houve decréscimo da viscosidade, como pode ser visualizado na Figura 6. O comportamento pseudoplástico é típico da xantana (Antunes, 2000).

A viscosidade é parâmetro determinante na seleção de cepas produtoras de biopolímeros, embora seja fundamental correlacioná-la com a produção devido ao aspecto econômico. Na indústria o maior interesse é por gomas que, adicionadas em concentrações mínimas (0,001 à 3 %), sejam capazes de espessar alimentos, fármacos e outros.

Antunes (2000) encontrou uma correlação inversa entre os dados de produção e de viscosidade da xantana produzida por cepas de *X. campestris* pv. *pruni*, com cepas mais produtivas produzindo gomas com qualidade inferior. Nesse estudo, não foi verificada correlação entre produção e viscosidade, verificando-se que a viscosidade obtida foi dependente da cepa (Figura 5) e independente da quantidade produzida. Estes resultados demonstraram que diversas cepas deste patovar de *X. campestris* têm potencial para serem exploradas na produção do biopolímero xantana, entretanto, torna-se necessária a seleção das cepas que apresentem melhor relação quantidade/qualidade da goma produzida, bem como de técnicas que permitam uma triagem mais rápida destas cepas.

Embora não se possa afirmar que exista uma relação entre viscosidade do biopolímero e origem da cepa (planta hospedeira), a que produziu o biopolímero menos viscoso foi aquele isolado da amendoeira (tabela 2, figura 5).

Sutherland (1983) citou que numerosos estudos têm demonstrado que diferentes cepas de *Xanthomonas* e diferentes condições de cultivo podem produzir polímeros com diferentes composições. Nesses trabalhos, os biopolímeros apresentaram perfis cromatográficos semelhantes entre si. Na sua composição, foram identificados o ácido glicurônico e os monossacarídeos glicose, manose e ramnose, confirmando resultado obtido por Antunes *et al.* (2000a) e Souza & Vendruscolo (1999). Já a xantana comercial não apresentou ramnose na sua composição, o que está de acordo com Moreira *et al.* (2001) e Antunes *et al.* (2000a).

Lowson & Symes (1977) relataram a presença de ramnose na xantana produzida por *X. juglandis*. Antunes *et al.* (2000a) sugeriram que a presença desse açúcar seja uma característica desejável, pois, em geral, os polímeros dos quais fazem parte possuem capacidade de formar géis verdadeiros.

Em relação à composição qualitativa, os biopolímeros foram iguais. Segundo Antunes *et al.* (2000b), os biopolímeros produzidos no MP11 parecem conter maior quantidade de manose e ácido glicurônico quando comparados com outros meios de produção, o que justificaria seu maior potencial espessante.

Considerando-se as 20 cepas estudadas, não foi possível estabelecer correlação entre composição química e produção, viscosidade e origem da cepa (planta hospedeira).

Os numerosos estudos na análise de seqüências de DNA têm promovido consideráveis informações que os métodos fenotípicos tradicionais não permitiam e, com isto, mais questões têm sido levantadas que não tinham sido previamente evidenciadas (Gurtler & Mayall, 2001).

Os métodos genéticos proporcionam valiosas informações adicionais para estudos taxonômicos, ecológicos e epidemiológicos de xantomonas fitopatogênicas (Leite *et al.*, 1994).

Segundo Yao *et al.* (1995), a análise por RAPD pode ser mais discriminatória que a análise do DNA utilizando eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) para tipagem epidemiológica das cepas de *X. maltophilia*. Usando RAPD, Ferreira *et al.* (1997) obtiveram uma variabilidade maior que aquela de ribotipagem, indicando a sensibilidade da técnica para detectar pequenas diferenças entre cepas similares. Wang *et al.* (1993) mostraram que análise de perfis RAPD é mais sensível que eletroforese de enzimas multilocos para detectar cepas muito próximas. Manulis *et al.* (1994) observaram que esta técnica foi tão sensível quanto os métodos sorológicos utilizados para a detecção de *X. campestris* pv. *pelargonii* em plantas, mas teve uma vantagem adicional, de ser mais específico.

Cooke *et al.* (1998), relataram que perfis RAPD permitem estudos de diversidade genética intraespecífico, mas não são bons instrumentos para tais análises em nível interespecífico. Já Tyler *et al.* (1997) constataram que uma das aplicações mais comuns da técnica do RAPD na microbiologia tem sido para a discriminação inter e intraespecífico de cepas de microrganismos.

Smith *et al.* (1994), utilizando RAPD, observaram que havia pequena diversidade genética em cepas do mesmo patovar, em particular *X. campestris* pv. *graminis*, *X. campestris* pv. *translucens* e *X. campestris* pv. *poannua*, o que foi verificado no nosso estudo com praticamente todos os isolados e *primers* utilizados (figuras 8 e 9). Ferreira *et al.* (1997), também utilizando esta técnica, encontraram pouco (1 a 3 bandas) ou nenhum produto de amplificação entre as 20 cepas de *X. campestris* pv. *vesicatoria* analisadas.

Pooler *et al.* (1996) utilizaram marcadores RAPD para estudar a diversidade genética entre cepas patogênicas de *X. fragariae* e verificaram que estas eram geneticamente muito semelhantes, apesar de terem sido isoladas em diferentes pontos geográficos de diversos países do mundo. Manulis *et al.* (1994) também observaram que diferentes cepas de *X. campestris* pv. *pelargonii*, isoladas de várias localizações geográficas e de diferentes cultivares de gerânio produziram padrões RAPD idênticos com vários *primers* arbitrários. Nesse trabalho, as cepas também foram provenientes de diversas localizações geográficas (tabela 2), e também apresentaram similaridades nos perfis RAPD (figuras 8 e 9).

Com relação à origem da cepa (planta hospedeira), o resultado foi interessante: com os dois *primers* selecionados (127 e 149), a cepa isolada de amendoeira (Xcp. 49) apresentou perfil genético diferenciado, obtendo-se um perfil diferente entre a cepa isolada de amendoeira e as de pessegueiro/ameixeira.

Em decorrência da enorme similaridade genética observada entre as cepas de *X. campestris* pv. *pruni*, não foi identificada nenhuma correlação entre perfil RAPD e produção de xantana, viscosidade e composição química. Portanto, não foi possível encontrar um marcador molecular que estivesse relacionado à produção, à viscosidade e à composição química da xantana.

Trébaol *et al.* (2001) obtiveram padrões RAPD similares para todas as cepas de *X. cynarae*, mas distintos daqueles observados em outras bactérias estudadas, o que também foi verificado nesse estudo, onde a cepa padrão de *X. campestris* pv. *campestris*, sempre mostrou perfil genético diferenciado. Entretanto, como pode ser visualizado nas figuras 9 e 10, não foi possível identificar uma banda que pudesse ser utilizada como marcador molecular em nível de patovar, com nenhum dos *primers* selecionados. Já Smith *et al.* (1994) identificaram, em muitas cepas de diversos patovares de *X. campestris*, um ou dois produtos maiores dominantes no perfil, com vários produtos menores também aparecendo. Entretanto, em alguns casos, um único produto destacou-se, ou vários produtos foram amplificados com nenhuma predominância.

Nessa pesquisa, o perfil genético de uma cepa isolada de amendoeira foi totalmente diferente dos demais. Isso indica a potencialidade da técnica RAPD

para encontrar um marcador molecular relacionado à origem da cepa (planta hospedeira) se for utilizado outro conjunto de *primers*.

Assim, com grande número de *primers* disponíveis comercialmente e a facilidade com que cada um pode ser testado, a técnica do RAPD pode se tornar uma ferramenta muito importante na identificação de fragmentos de DNA, patovar e espécie específicos.

6. CONCLUSÕES

1. Nas cepas testadas, não houve relação entre produção X viscosidade X composição química.
2. Com os *primers* testados, não foi possível estabelecer relação entre perfil RAPD e produção, perfil RAPD e viscosidade e perfil RAPD e composição química.
3. Com os *primers* testados, houve diferenciação genética entre a cepa isolada de amendoeira e aquelas oriundas de pessegueiro e ameixeira.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 3^a edition. Califórnia: Ed. Academic Press, Inc. San Diego, 1988.

ALLIPI, A.M. Histopatologia de folhas de tomate inoculadas com *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Agronomie**, 12, p. 115-122, 1992.

ANTUNES, A.E.C. **Produção, viscosidade e composição de xantana por *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* em meios convencionais e alternativos**. Pelotas, 2000.63f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel, 2000.

ANTUNES, A.E.C.; MOREIRA, A.S.; VENDRUSCOLO, J.L.S. & VENDRUSCOLO, C.T. Viscosidade aparente de biopolímeros produzidos por diversas cepas de *Xanthomonas campestris* pv *pruni*. **Ciência e Engenharia**, v. 9, n. 1, p. 83-87, 2000a.

ANTUNES, A.E.C.; MOREIRA, A.S.; VENDRUSCOLO, J.L.S. & VENDRUSCOLO, C.T. Síntese de biopolímero xantana em meios convencionais e alternativos: viscosidade X composição. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 6, n. 2, p. 83-87, 2000b.

ARIAS, C.R.; PUJALTE, M.J.; GARAY, E.; AZNAR, R. Genetic relatedness among environmental, clinical and diseased-eel *Vibrio vulnificus* isolates from different geographic regions by ribotyping and randomly amplified polymorphic DNA PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3403-3410, 1998.

BAIRD, J.K. & PETTITT, D.J. Biogums used in food and made by fermentation. In: GOLDBERG, I. & WILLIAMS, R. **Biotechnology and Food Ingredients**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991, p. 223-263.

- BARRÉRE, G.C.; BARBER, C.E. & DANIELS, M.J. Molecular cloning of genes involved in the biosynthesis of the extracellular polysaccharide xanthan by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **International Journal Biological Macromolecules**, 8, p. 372-374, 1986.
- BERTHIER, Y.; VERDIER, V.; GUESDON, J.; CHEVRIER, D.; DENIS, J.; DECOUX, G.; LEMATTRE, M. Characterization of *Xanthomonas campestris* pathovars by rRNA gene restriction patterns. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 851-859, 1993.
- BETZ, D. A. Xanthan Gum, a biosynthethic polysaccharide for the food industry. **Food Technology**, v.31, p.11-16, 1979.
- BRADBURY, J.F. *Xanthomonas* Dowson. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, KRIEG, N.R. & HOLT, J.G., eds. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994, v. 1, 964p.
- CADMUS, M.C.; KNUTSON, C.A.; LAGODA, A.A.; PITTSLEY, J.E.; BURTON, K.A. Synthetic media for production, of quality xanthan gum in 20 liter fermentors. **Biotechnology Bioengineering**, v. 20, p. 1003-1014, 1978.
- CAETANO-ANÓLLES, G; BASSAM. B.J. & GRESSHOFF, P.M. High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Biotechnology**, 9, p. 553-557, 1991.
- CAMPBELL, M.; MAHENTHIRALINGAM, E.; SPEERT, D.P. Evaluation of Random Amplified Polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n 12, p. 4614-4615, 2000.
- CHRISTIANSON, D.D.; GARDNER, H.W.; WARNER, K.; BOUNOY, B.K. & INGLET, G.E. Xanthan gum in protein-fortified starch bread. **Food Technology**, v. 28, n. 6, 1974.
- CHURMS, S.C. Carbohydrates. In: ZWEIG, G.; SHERMA, J. ed. **Handbook of chromatography**, v.1, Boca Raton: CRC Press, 1982. 189p.
- CIVEROLO, E. L. & HATTINGH, M.J. *Xanthomonas campestris* pv *pruni*: Cause of Prunus Bacterial Spot. In: SWINGS, J. G. & CIVEROLO, E. L. **Xanthomonas**, London: Chapman & Hall, 1993, 399p.
- COOKE, D. E. L.; FORSTER, J. W.; JENKIS, P. D.; JONES, D. G. and LEWIS, D. M. Analysis of intraspecific and interspecific variation in the genus *Alternaria* by the use of RAPD-PCR. **Annual Applied Biology**, 132, p. 197-209, 1998.
- COTTRELL, I. W. Industrial potential of fungal and bacterial polysaccharides. In: SANDFORD, P. A.; MATSUDA, K. American Chemical Society, 1979, p. 251/270 (ACS Symposium Series, 126).
- CRUEGER, W. & CRUEGER, A. **Biotechnologia: Manual de Microbiologia Industrial**. 3^a ed. Zaragoza: Acribia, 1993.

- DANIELS, M.J.; BARBER, C.E.; TURNER, P.C.; SAWCZYK, M.K.; BYRDE, R.J.W. & FIELDING, A.H. Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris*. **EMBO Journal**, 3, p. 3323-3328, 1984.
- DANIELS, M.J.; DOW, J.M. & OSBOURN, A.E. Molecular genetics of pathogenicity in phytopathogenic bacteria. **Annual Review Phytopathology**, 26, p. 285-312, 1988.
- DENNY, T.P. Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. **Annual Review Phytopathology**, 33, p. 173-197, 1995.
- DESTRO, M.T. **Curso 6: Métodos para tipagem molecular de microrganismos de interesse em alimento**. Foz do Iguaçu, 2001, 20p.
- DIZIEZAK, J.D. A focus on gums. **Food Technology**, March, p. 166-132, 1991.
- FERREIRA, H.; BERIAM, L.O.S.; GONÇALVES, E.R.; ROSATO, Y.B. Characterization of Brazilian isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by ribotyping and RAPD. **Fitopatologia brasileira**, 22, p. 178-185, 1997.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998, 220p.
- FORTES, J.F. & MARTINS, O.M. *In*: MEDEIROS, C.A.B. & RASEIRA, M.C.B. **A cultura do pessegueiro**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1998, 351p.
- GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V.E.; CASAS, J.A. & GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 549-579, 2000.
- GURTLER, V. & MAYALL, B.C. Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 51, p. 3-16, 2001.
- HAYWARD, A.C. Bacteriophage sensitivity and biochemical group in *Xanthomonas malvacearum*. **Journal of General Microbiology**, 35, p. 287-298, 1964.
- JEANES, A. Extracellular microbial polysaccharides – New hydrocolloids of interest to the food industry. **Food Technology**, v. 28, n. 5, p. 34-40, 1974.
- KAO, C.C., BARLOW, E. & SEQUEIRA, L. Extracellular polysaccharide is required for wild-type virulence of *Pseudomonas solanacearum*. **Journal of Bacteriology**, 174, p. 1068-1071, 1992.
- KENNEDY, J.F.; JONES, P.; BARKER, S.A. Factors affecting microbial growth and polysaccharide production during the fermentation of *Xanthomonas campestris* cultures. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 4, n. 1, p. 39-43, 1982.

- LEITE, R.P.; MINSAVAGE, G.V.; BONAS, U. & STALL, R.E. Detection and identification of phytopathogenic *Xanthomonas* strains by amplification of DNA sequences related to the hrp genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 1068-1077, 1994.
- LEYNS, F.; DE CLEENE, M.; SWINGS, J. & DE LEY, J. The host range of the genus *Xanthomonas*. **The Botanical Review**, 50, p. 308-355, 1984.
- LILLY, V. G.; WILSON, H. A.; LEARCH, J. G. Bacterial polysaccharides II. Laboratory Scale production of polysaccharides by species *X. campestris*. **Applied Microbiology**, v. 6, p. 105-109, 1958.
- LOWSON, C.J.; SYMES, K.C. Oligosaccharides produced by partial acetolysis of xanthan gum. **Carbohydrates Research**, v. 58, p. 433-438, 1977.
- MANULIS, S.; VALINSKY, L.; LICHTER, A. & GABRIEL, D.W. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *Pelargonii* with DNA primers and probes identified by random amplified polymorphic DNA analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 11, p. 4094-4099, 1994.
- MARGARITIS, A. & PACE, G.W. In: MOO-YOUNG, M. **Comprehensive Biotechnology**, vol. 3, p. 1005-1043, 1985.
- MARGARITIS, A. & ZAJIC, J.E. Biotechnology review: mixing mass transfer and scale-up of polysaccharide fermentations. **Biotechnology Bioengineering**, 20, p. 939-1001, 1978.
- MILAS, M.; RINAUDO, M.; TINLAND, B. Comparative Pepolymerization of xanthan gum by ultrasonic enzymic treatments. Rheological and structural properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 6, p. 95-107, 1986.
- MOREIRA, A.S.; SOUZA, A.S.; VENDRUSCOLO, C.T. Determinação da composição de biopolímero por cromatografia em camada delgada: metodologia. **Agrociência**, v.4, n. 3, p. 222-224, 1998.
- MOREIRA, A.S.; VENDRUSCOLO, J.L.S.; GIL-TURNES, C. & VENDRUSCOLO, C.T. Screening among 18 novel strains of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. **Food Hydrocolloids**, 15, p. 469-474, 2001.
- NITSCHKE, M. & THOMAS, R.W.S.P. Xanthan gum production by wild-type isolates of *Xanthomonas campestris*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 11, p. 502-504, 1995.
- NITSCHKE, M. & RODRIGUES, V. Effect of virulence and serial transfers of *Xanthomonas campestris* on xanthan gum production. **Brazilian Journal of Microbiology**, 31, p. 58-60, 2000.
- PACE, G.W. In: KRISTIANSEN, B. & BU'LOCK, **Journal Basic Biotechnology**, p. 449-462, 1987.

- PETTITT, D.J. Xanthan gum. In: GLICKSMAN, M.(ed) **Food Hydrocolloids**, v. 1, p. 128-149, 1982.
- POOLER, M.R.; RITCHIE, D.F.; HARTUNG, J.S. Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for identification of this phytopathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, nº 9, p. 3121-3127, 1996.
- RAMIREZ, M.E.; FUCIKOVSKY, L.; JIMENEZ, G.; QUINTERO, R. & GALINDO, E. Xanthan gum production by altered pathogenicity variants of *Xanthomonas campestris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 5-10, 1988.
- ROITMAM, I.; TRAVASSOS, L.R. & AZEVEDO, J.L. **Tratado de Microbiologia**, v. 1. São Paulo: Manole, 1987, 196p.
- SMITH, J.J.; SCOTT-CRAIG, J.S.; LEADBETTER, J.R. & BUSH, G.L. Characterization of random amplified polymorphic DNA (RAPD) products from *Xanthomonas campestris* and some comments on the use of RAPD products in phylogenetic analysis. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 3, n. 2, p. 135-145, 1994.
- SOUZA, A. da S., VENDRUSCOLO, C. T. Produção e caracterização dos biopolímeros sintetizados por *Xanthomonas campestris* pv *pruni* cepas 24 e 58. **Ciência e Engenharia**, v. 8, n. 2, p. 115-123, 1999.
- SUTHERLAND, I.W. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. **Advances in Microbial Physiology**, v. 23, p. 80-142, 1982.
- SUTHERLAND, I.W. Extracellular polysaccharide. In: DELLWEY, H. **Biotechnology**. Weinhein: Verlag Chemie, v. 3, p. 553-574, 1983.
- SUTHERLAND; I. W. Xanthan. In: SWINGS, J. G. & CIVEROLO, E. L. **Xanthomonas**, London: Chapman & Hall, 1993, 399p.
- TAKATSU, A. Classificação atual de bacterias fitopatogênicas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 8, p. 93-120, 2000.
- TRÉBAOL, G.; MANCEAU, C.; TIRILLY, Y. & BOURY S. Assessment of the genetic diversity among strains of *Xanthomonas cynarae* by randomly amplified polymorphic DNA analysis and development of specific characterized amplified regions for the rapid identification of *X. cynarae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 8, p. 3379-3384, 2001.
- TYLER, K.D.; WANG, G.; TYLER, S.D. & JOHNSON, W.M. Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 339-346, 1997.

- VENDRUSCOLO, C.T. **Produção e caracterização do biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp isolada do solo cultivado com cana de açúcar da região de Ribeirão Preto – São Paulo – Brasil.** Campinas, 1995. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1995.
- WANG, G.; WHITTAM, T. S.; BERG, C. M. & BERG, D. D. RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme eletrophoresis for distinguishing related bacterial strains. **Nucleic Acids Research**, 21, p. 5930-5933, 1993.
- WELSH, J. & MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, 18, p. 7213-7218, 1990.
- WILLIAMS, J.G.; KUBELINK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, L.A. & TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18, p. 6531-6535, 1990.
- YAO, J.D.C.; CONLY, J.M. & KRAJDEN, M. Molecular typing of *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* by DNA macrorestriction analysis and random amplified polymorphic DNA analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 8, p. 2195-2198, 1995.