



**Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Fitopatologia**

**Diagnose Molecular do Cancro Bacteriano da Videira Causado por  
*Xanthomonas campestris* pv. *viticola***

**Loiselene Carvalho da Trindade**

**Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Fitopatologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Fitopatologia.**

**Orientadora: Profa. Marisa A. S. Velloso Ferreira**

**Brasília-DF  
2007**

**Trabalho de tese realizado junto ao Departamento de Fitopatologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da Professora Marisa A. S. Velloso Ferreira, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).**

**Aprovado por:**

---

**Profa. Dra. Marisa A. S. Velloso Ferreira (Orientadora)**  
**Departamento de Fitopatologia**  
**Universidade de Brasília**

---

**Prof. Dr. Carlos H. Uesugi (Examinador)**  
**Departamento de Fitopatologia**  
**Universidade de Brasília**

---

**Dra. Abi Soares dos Anjos Marques (Examinadora)**  
**Laboratório de Quarentena Vegetal, Unidade de Bacteriologia**  
**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

---

**Dra. Mirtes Freitas Lima (Examinadora)**  
**Laboratório de Fitopatologia**  
**Embrapa Semi-Árido**

---

**Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller (Examinador)**  
**Laboratório de Biotecnologia**  
**Universidade Católica de Brasília**

**“(...) A natureza raramente traça linhas sem embaçá-las. (...)”  
Vanderplank (1963)**

*À minha filha Maria Luísa*

*Com todo amor*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

---

A Deus por tudo que tenho nesta vida e por todos os sonhos até aqui realizados.

Ao meu marido Marcos Rocha e a minha filha, Maria Luísa, pela compreensão nos momentos de dificuldade, pelo incentivo e pelo seu amor.

Ao meu pai Luís Trindade e meu irmão Matheus Trindade, pelo carinho e apoio.

A minha família sempre presente.

À professora Marisa A. S. V. Ferreira pela orientação, confiança e amizade.

À Dra. Daniela B. Lopes e Dra. Mirtes Freitas Lima e a todos os colaboradores da Embrapa Semi-Árido que tornaram possível a realização deste trabalho.

A professora Marlene De-Souza do Departamento de Microbiologia, da Universidade de Brasília, pela colaboração e sugestões que auxiliaram no desenvolvimento desta tese.

À professora Cláudia Renata F. Martins (*in memoriam*) e todos os seus alunos pelas trocas de conhecimentos, sugestões e colaborações.

Ao professor Renato Resende do Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília e a todos os amigos que fiz por lá.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, da Universidade de Brasília, que contribuíram para minha formação acadêmica.

Aos meus amigos queridos Giovana Maria T. Arruda, Eder Marques e Priscila Rayane.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília.

À EMATER-DF pela oportunidade de colocar em prática todos os ensinamentos aprendidos nesta caminhada.

Aos professores da Banca Examinadora pelos ensinamentos e sugestões.

Aos amigos que aqui em Brasília fiz nestes anos que aqui estou.

## ÍNDICE

---

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1- A CULTURA DA VIDEIRA.....	1
2- O CANCRO BACTERIANO DA VIDEIRA .....	6
2.1- Histórico e Distribuição Geográfica.....	6
2.2 - Sintomatologia.....	11
2.3 - Etiologia.....	13
2.4 - Epidemiologia.....	15
2.5 - Diagnose.....	18
2.6 - Controle.....	19
JUSTIFICATIVAS E HIPÓTESE.....	23
OBJETIVOS.....	25
CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO MOLECULAR PARA DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> .....	26
1 - Introdução.....	26
2 - Material e Métodos.....	29
2.1 - Estirpes bacterianas: origem e manutenção.....	29
2.2 - Extração de DNA.....	32
2.3 - Amplificação e seqüenciamento da região <i>hrpB6</i> de <i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i> .....	33
2.4 - Desenho e seleção de iniciadores.....	34
2.5 - Especificidade dos iniciadores.....	36
2.6 - PCR-RFLP.....	36
2.7- Sensibilidade dos iniciadores.....	37
2.8 - Detecção de <i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i> em tecidos de plantas sintomáticas.....	37
3- Resultados.....	38
3.1 - Desenho de iniciadores baseados nas seqüências do gene <i>hrpB6</i> .....	38
3.2 - Especificidade dos iniciadores.....	38
3.3-PCR-RFLP.....	42
3.4- Sensibilidade dos iniciadores.....	44

3.5 - Detecção de <i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i> em tecidos de plantas sintomáticas.....	46
4- Discussão.....	40
CAPÍTULO 3 – DIAGNOSE MOLECULAR DO CANCRO BACTERIANO DA	
VIDEIRA.....	51
1- Introdução.....	51
2 - Material e Métodos.....	56
2.1- Experimento 1 - Detecção de <i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i> por Nested-PCR em extratos obtidos de tecidos de plantas de videiras sintomáticas e assintomáticas previamente enriquecidos em meio líquido.....	57
2.2.- Experimento 2 - Otimização do tempo de incubação em meio líquido para detecção e identificação de <i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i> em amostras de videiras sintomáticas e assintomáticas.....	59
2.3.- Experimento 3- Avaliação de diferentes meios de cultura na detecção e identificação de <i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i> em videiras sintomáticas e assintomáticas por PCR.....	59
2.4 - Experimento 4- Detecção de <i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i> em plantas de videiras inoculadas antes do aparecimento dos sintomas.....	60
2.5- Experimento 5 - Detecção de <i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i> em plantas de videiras sintomáticas através de BIO-PCR e PCR-direta.....	61
3-Resultados.....	63
3.1 - Detecção de <i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i> por Nested-PCR em extratos obtidos de tecidos de plantas de videiras sintomáticas e assintomáticas previamente enriquecidos em meio líquido.....	63
3.2. Experimento 2 - Otimização do tempo de incubação em meio líquido para detecção e identificação de <i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i> em videiras sintomáticas e assintomáticas.....	70
3.3. Experimento 3- Avaliação de diferentes meios de cultura na detecção e identificação de <i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i> em videiras sintomáticas e assintomáticas por PCR.....	73
3.4- Experimento 4- Avaliação da detecção de <i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i> em plantas de videiras inoculadas antes do aparecimento dos sintomas.....	75
3.5- Experimento 5 - Detecção de <i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i> em plantas de videiras sintomáticas através de BIO-PCR e PCR-direta.....	77
4- Discussão.....	81
CAPÍTULO 4 - PATOGENICIDADE CRUZADA E RELACIONAMENTO GENÉTICO ENTRE AS PATOVARES <i>viticola</i> e <i>mangiferaeindicae</i> de <i>Xanthomonas</i> NO BRASIL.....	
1. Introdução.....	89

2. Material e Métodos.....	97
2.1. Avaliação da patogenicidade cruzada em mudas de videira e mangueira.....	97
2.1.1. Estirpes bacterianas e preparo do inóculo.....	97
2.1.2. Método de inoculação e desenho experimental.....	99
2.1.3. Avaliação dos sintomas e reisolamentos.....	99
2.2. Estudo filogenético das estirpes de <i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i> e <i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> .....	100
2.2.1. Estirpes bacterianas utilizadas neste estudo.....	100
2.2.2. Cultivo e preservação das estirpes.....	101
2.2.3 Extração e quantificação de DNA genômico.....	101
2.2.4. Análise de seqüências da região semelhante ao gene do citocromo <i>b561</i> e desenho de iniciadores para esta região.....	102
2.2.5.- Amplificação da região ITS do DNA ribossomal , 16S rRNA, citocromo <i>b561</i> .....	102
2.2.6. – Condições para amplificação por PCR.....	104
2.2.6.1 Região espaçadora (ITS) do rDNA e 16S rRNA.....	104
2.2.6.2.- Região correspondente ao gene <i>hrpB6</i> .....	104
2.2.6.3.- Região semelhante ao gene do citocromo <i>b561</i> .....	105
2.2.7.- Análise e purificação dos produtos de PCR e seqüenciamento.....	105
2.2.8- Análise do seqüenciamento e construções das árvores filogenéticas.....	106
2.3. - Estudo do perfil plasmidial.....	107
2.3.1. Extração de DNA plasmidial.....	107
2.3.2.- Análise do perfil plasmidial.....	108
3. Resultados.....	109
3.1. Avaliação da patogenicidade cruzada em mudas de videiras e mangueira.....	109
3.2. Análises filogenéticas.....	115
3.3. Análise do perfil plasmidial.....	123
4. Discussão.....	126
Conclusões Gerais.....	131
Referências Bibliográficas.....	132
Anexos.....	152

## ÍNDICE DE TABELAS

---

	Página
<b>Tabela 1.</b> Produção de uvas no Brasil em toneladas nos anos de 2005 e 2006 por região e principais estados produtores.....	2
<b>Tabela 2.</b> Estirpes bacterianas utilizadas neste estudo.....	31
<b>Tabela 3.</b> Descrição das possíveis combinações utilizando iniciadores desenhados neste estudo e o iniciadores RST2/RST3 de Leite Jr. <i>et al.</i> (1994) para amplificação de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> .....	35
<b>Tabela 4.</b> Detecção de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> em folhas, pecíolos, ramos e bagas naturalmente infectadas coletadas em Petrolina-PE e processadas no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Semi-árido, Petrolina-PE (Data de coleta 11/04/2005).....	65
<b>Tabela 5.</b> Detecção de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> em folhas, pecíolos e ramos naturalmente infectadas, coletadas em Petrolina-PE, processadas no laboratório de Fitopatologia da Universidade de Brasília-DF (Data da coleta 25/04/2005).....	68
<b>Tabela 6.</b> Detecção de <i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i> através de BIO-PCR, com diferentes tempos de crescimento em meio 523 líquido.....	71
<b>Tabela 7.</b> Comparação entre meios líquidos para a detecção via BIO-PCR de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> , com tempo de incubação de nove horas.....	74
<b>Tabela 8.</b> Avaliação do tempo para detecção de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> em plantas de videiras sintomáticas e assintomáticas por PCR.....	76
<b>Tabela 9.</b> Detecção de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> em folhas, pecíolos, ramos e bagas naturalmente infectadas, coletadas na Área 1 em Petrolina-PE, em março de 2007.....	78
<b>Tabela 10.</b> Detecção de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> em folhas, pecíolos, ramos e bagas naturalmente infectadas coletadas na Área 2 em Petrolina-PE, em março de 2007.....	80
<b>Tabela 11.</b> Estirpes bacterianas de <i>Xanthomonas campestris</i> utilizadas neste estudo.....	98
<b>Tabela 12.</b> Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação da região ITS do DNA ribossomal (rDNA), 16S rRNA, do gene citocromo <i>B561-like</i> e <i>hrpB6</i> do DNA das estirpes bacterianas utilizadas neste estudo.....	103
<b>Tabela 13.</b> Inoculação cruzada pelo método de infiltração no limbo foliar em folhas de videira da cv. Festival e mangueira cv. Tommy Atkins das estirpes de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> e de <i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> .....	111
<b>Tabela 14.</b> Avaliação da patogenicidade cruzada pelo método de pulverização, em videira da cv. Festival e mangueira cv. Tommy Atkins, das estirpes Unb 1183 de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> e de UnB 769 de <i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> .....	114
<b>Tabela 15.</b> Número e tamanho estimado dos plasmídeos detectados em <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> e <i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> .....	124

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Distribuição geográfica do cancro bacteriano da videira no Brasil, cuja ocorrência já foi relatada nos estados indicados.....	10
<b>Figura 2.</b> Sintomas do cancro bacteriano da videira, causado por <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> na cv. Festival (A) e na cv. Red Globe (B, C, D, E e F). A e B - Lesões nas nervuras e manchas foliares; C e D- Cancro nos ramos; E- Lesões necróticas nas bagas; F- Cancro na ráquis.....	12
<b>Figura 3.</b> Esquema da posição e orientação dos iniciadores desenhados neste estudo para a amplificação da região <i>hrpB6</i> de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> utilizando os iniciadores RST2 /RST3 de Leite Jr. et al. (1994).....	35
<b>Figura 4.</b> Alinhamento das seqüências parciais do gene <i>hrpB</i> de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> (NCPBP 2475), <i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> (UnB 764) e <i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> (UnB 1111) amplificadas com os iniciadores RST2 e RST3. A identidade nucleotídica está indicada por *; (--) indicam gaps e deleções e as regiões sublinhadas e negritadas indicam a posição e a seqüências dos três iniciadores desenhados e sintetizados neste estudo.....	39
<b>Figura 5.</b> Especificidade da amplificação por PCR com o par de iniciadores RST2/Xcv3R, visualizada em gel de agarose a 1 %. M- 100 pb-ladder (GIBCO/BRL); linhas (1)-NCPBP 2475; (2)- UnB 1186; (3)- UnB 1187; (4)- IBSBF 1369; (5) UnB 682; UnB 675; (7)- UnB 674; (8)- UnB 684; (9)- UnB 676; (10)- UnB 764; (11)- UnB 769; (12)- IBSBF 1230; (13)- IBSBF 1508; (14)- DNA de folha de videira; (15) <i>Ralstonia solanacearum</i> e CN- Controle Negativo. Linhas 1-4: <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> ; Linhas 5-9: <i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> ; Linhas 10-13: <i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> .....	42
<b>Figura 6.</b> Digestão com a enzima de restrição <i>HaeIII</i> dos produtos de PCR amplificados com os iniciadores RST2/Xcv3R e separados em gel de poliacrilamida a 21%. M1: 10 pb-ladder; M2: 100 bp ladder; linhas (1)-NCPBP 2475 – produto não digerido; (2)-NCPBP 2475; (3)- UnB 1186; (4)- UnB 1187; (5)- UnB 764 – produto não digerido; (6)- UnB 764; (7)- UnB 769; (8)- IBSBF 1230; (9)- IBSBF1508 (10)- UnB 682 – produto não digerido; (11)- UnB 682; (12)- UnB 675; (13)- UnB 674; (14)- UnB 684; (15) - UnB 676. Linhas 1 – 4: <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> ; linhas 5-9 <i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> ; linhas 10-15: <i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> .....	43
<b>Figura 7.</b> Limiar de detecção do DNA de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> amplificado com os iniciadores RST2/ Xcv3R. (A)- Diluições em série do DNA estirpe NCPBP 2475. M-100 bp ladder; Linha 1- 10 ng; 2- 1 ng; 3- 0,01 ng; 4- 0,001 ng; 5- 0,0001 ng; 6- 0,00005 ng; CN – controle negativo. (B)- Diluições em série da suspensão de células da estirpe NCPBP 2475. Linha 1- 10 <sup>9</sup> UFC/ml; 2- 10 <sup>8</sup> UFC/ml; 3- 10 <sup>7</sup> UFC/ml; 4- 10 <sup>6</sup> UFC /ml; 5- 10 <sup>5</sup> UFC/ml; 6- 10 <sup>4</sup> UFC/ml.(C)- Nested-PCR com os <i>primers</i> Xcv1F/Xcv3R. Produtos de PCR obtidos com os <i>primers</i> RST2/ Xcv3R (Figura 2B) foram diluídos (1:50) e utilizados em uma segunda rodada de amplificação. M1- 1 Kb ladder; M- 100 bp ladder; linha 1- 10 <sup>9</sup> UFC/ml; 2- 10 <sup>8</sup> UFC/ml; 3 – 10 <sup>7</sup> UFC/ml; 4- 10 <sup>6</sup> UFC/ml; 5- 10 <sup>5</sup> UFC/ml, 6- 10 <sup>4</sup> UFC/ml, 7- 10 <sup>3</sup> UFC/ml, 8- 10 <sup>2</sup> UFC/ml, 9- 10 UFC /ml; CN- Controle Negativo.....	45

- Figura 8.** . Detecção e identificação de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em pecíolos sintomáticos inoculados. **(A)** Amplificação por PCR com o par de iniciadores RST2/Xcv3R visualizados em gel de agarose 1%: M- 100 pb-ladder (GIBCO/BRL); linha 1- UnB 1186 (DNA purificado); linha 2- *X.campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 1230 (DNA purificado); linha 3- lavado da placa a partir de tecido macerado após 72 horas de incubação; linha 4- uma única colônia após 72 horas de incubação; CN- Controle negativo. **(B)**- Digestão com a enzima de restrição *HaeIII* dos produtos de PCR amplificados com os iniciadores RST2/Xcv3R e separados em gel de agarose 2,5%. Mesma seqüência das amostras da Figura 8<sup>a</sup>..... 47
- Figura 9.** Eletroforese em gel de agarose a 1 % dos produtos de PCR obtidos através de Nested-PCR das amostras processadas de Petrolina, PE. M-Marcador 100 pb DNA ladder (Gibco-BRL); linhas 1 a 4 - amostras de folhas; linhas 5 a 8- amostras de pecíolos; linhas 9 a 12 - amostras de ramos; linhas 13 a 16- amostras de bagas. Figura 1B: linhas 17 a 20 - amostras de ráquis. -água e 21-Controle Positivo (suspensão de células obtidas de folhas de videira inoculada com *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, UnB 1183), 22- Controle Negativo-água – somente meio, 23- Controle negativo- somente meio 523; linha 24- controle negativo folha não inoculada,; linha 25- controle negativo do 1º ciclo; 26- controle negativo do 2º ciclo ..... 66
- Figura 10.** Eletroforese em gel de agarose a 1 % dos produtos de PCR obtidos através de Nested-PCR das amostras de videira, coletadas em Petrolina, PE e processadas em Brasília, DF. Figura 10A: M-Marcador 100 pb DNA ladder (Gibco-BRL); linhas 1 a 4 - amostras de folhas; linhas 5 a 8- amostras de pecíolos; linhas 9 a 12 - amostras de ramos; linhas 13 a 16- amostras de bagas. Figura 1B: linhas 17 a 20 - amostras de ráquis. CN- Controle Negativo -água e CP - Controle Positivo ((suspensão de células obtidas de folhas de videira inoculada com *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, UnB 1183)..... 69
- Figura 11.** Curva de crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em meio líquido, de Kado & Heskett (1970), em função do tempo, sob condições ideais. Absorbância 600 nm..... 72
- Figura 12.** (A) Sintomas de mancha angular em folhas de mangueira causados por *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* em mangueira. Fonte: Cunha *et al.*(2000). (B) Sintomas do cancro bacteriano em folha de videira, cv. Red Globe, causados por *X. campestris* pv. *viticola* no Submédio do Vale São Francisco, Pernambuco, PE..... 90
- Figura 13.** Sintomas iniciais observados nos bordos do limbo foliar em plantas de videira, cv. Festival, inoculadas através de pulverização com as estirpes (A) UnB 1183 de *Xanthomonas. campestris* pv. *viticola* e (B) UnB 769 de *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*..... 113
- Figura 14.** Amplificação por PCR com o par de iniciadores RST2/Xcv3R, visualizada em gel de agarose a 1 %. M- 100 pb-ladder (GIBCO/BRL); linha CP- Controle positivo: suspensão de células de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, linhas 1 e 2- planta de videira inoculada com as estirpes UnB 1183; linhas 3 e 4 planta de videira inoculada com a estirpe UnB 769; linhas 5 e 6- planta de manga inoculada com a estirpe UnB 1183; Linhas 7 e 8 – planta de manga inoculada com a estirpe UnB 769 e CN – Controle negativo..... 114

- Figura 15.** Árvore filogenética gerada a partir de seqüências da região ITS de cinco estirpes de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (NCPBP 2475, UnB 1183, UnB 1205, IBSBF 1386, IBSBF 1369) e cinco de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (UnB 764, UnB 769, IBSBF 1230, IBSBF 1508, CCP 76) e seqüências depositadas no GenBank de *X. campestris* pv. *campestris* (AE012540); *X. axonopodis* pv. *citri* (AF442744) A árvore consenso foi gerada através do programa Phylip e TreeView e valores de Bootstrap (1000 repetições) estão localizados nos nodos da árvore. A determinação dos grupos filogenéticos está descrito à direita da árvore..... 116
- Figura 16.** Árvore filogenética gerada a partir de seqüências 16S rRNA de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (NCPBP 2475, UnB 1183, UnB 1205, IBSBF 1386, IBSBF 1369), cinco de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (UnB 764, UnB 769, IBSBF 1230, IBSBF 1508, CCP 76) e seqüências depositadas no GenBank de *X. campestris* pv. *campestris* (AE11254); *X. axonopodis* pv. *citri* (DQ991194); *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* (EF989732) e *X. fastidiosa* estirpe 9a-5c (AE009442) e *X. fastidiosa* (NC004556). A árvore consenso foi gerada através do programa Phylip e TreeView e valores de Bootstrap (1000 repetições) estão localizados nos nodos da árvore. A determinação dos grupos filogenéticos está descrito à direita da árvore..... 118
- Figura 17.** Árvore filogenética gerada a partir de seqüências Citocromo *b561*-like de uma estirpe de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (IBSBF 1369) e duas de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* ( IBSBF 1508, IBSBF 1230) e seqüências depositadas no GenBank de *X. campestris* pv. *campestris* (CP000050); *X. axonopodis* pv. *citri* (AE011801) e *X. fastidiosa* (videira) (NC004556) A árvore consenso foi gerada através do programa Phylip e TreeView e valores de Bootstrap (1000 repetições) estão localizados nos nodos da árvore. A determinação dos grupos filogenéticos está descrito à direita da árvore..... 121
- Figura 18.** Árvore filogenética gerada a partir de seqüências *hrpB6* de cinco estirpes de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (NCPBP 2475, UnB 1183, UnB 1205, IBSBF 1386, IBSBF 1369) e cinco de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (UnB 764, UnB 769, IBSBF 1230, IBSBF 1508, CCP 76) e seqüências depositadas no GenBank de *X. campestris* pv. *campestris* (XCHRPB6 M99174.1); *X. axonopodis* pv. *citri* XAC (XAC AE011666) e *X. oryzae* pv. *oryzae* (AE013598) A árvore consenso foi gerada através do programa Phylip e TreeView e valores de Bootstrap (1000 repetições) estão localizados nos nodos da árvore. A determinação dos grupos filogenéticos está descrito a direita da árvore..... 122
- Figura 19.** Eletroforese em gel de agarose 0,6% (TAE) do DNA plasmidial de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (linha 2- NCPBP 2475; 3-1183; 4-IBSBF 1386; 5- IBSBF 1369; 6- UnB 1205) e *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (linha 1-CCP76;7- UnB 769, 8-UnB 764; 9- IBSBF 1230; 10- IBSBF 1508) extraído a partir do protocolo modificado de Sambrook e Russel (2001). M- Marcador  $\lambda$ DNA digerido com *HindIII*..... 125

## RESUMO

---

A bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, agente do cancro bacteriano da videira, foi relatada pela primeira vez nas áreas irrigadas do Submédio do Vale São Francisco em Petrolina, Pernambuco, em 1998. A doença também foi identificada em Juazeiro, Bahia, e posteriormente no Piauí, no Ceará, Roraima e Goiás. O uso de material propagativo livre do patógeno tornou-se uma preocupação, uma vez que a ocorrência da bacteriose ainda esta restrita a essas regiões no país e existe o risco de disseminação para outras regiões produtoras no sul e sudeste do Brasil.

Com o objetivo de desenvolver um método molecular para detecção e identificação dessa bactéria, três oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados com base no seqüenciamento parcial do gene *hrpB*. As combinações de iniciadores Xcv1F/Xcv3R e RST2/Xcv3R foram testados quanto à especificidade e sensibilidade para detecção do DNA de *X. campestris* pv. *viticola*. Com os dois pares de iniciadores, a amplificação foi positiva com o DNA das 44 estirpes de *X. campestris* pv. *viticola* testados, com quatro estirpes da patovar *mangiferaeindicae*, e cinco estirpes de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. Contudo, a digestão dos produtos de PCR com *Hae*III permitiu diferenciar as estirpes das três patovares. Nenhum dos dois pares de iniciadores amplificou o DNA de videira, de 20 bactérias não patogênicas da flora da videira, e de nove estirpes de outros sete gêneros de bactérias fitopatogênicas. A sensibilidade dos iniciadores Xcv1F/Xcv3R e RST2/Xcv3R foi de 10 pg e 1 pg de DNA purificado de *X. campestris* pv. *viticola*, respectivamente. O limiar de detecção de RST2/Xcv3R foi de  $10^4$  UFC/ml, mas empregando-se um segundo ciclo de amplificação com o iniciador interno Xcv1F, esse limiar foi reduzido para  $10^2$  UFC/ml.

Os iniciadores foram testados na detecção da bactéria em pecíolos inoculados com a estirpe UnB 1186 e embora não se tenha tido sucesso na PCR com o extrato do macerado do tecido sintomático, foi possível detectar o patógeno usando-se lavado de placas após o crescimento por 72 h ou a partir de uma única colônia diluída em 200  $\mu$ l de água. A identidade da bactéria foi confirmada pela análise de RFLP, que gerou o padrão típico de *X. campestris* pv. *viticola*.

Com o uso de nested-BIO-PCR utilizando dois ciclos de amplificação com os iniciadores RST2/Xcv3R e Xcv1F/Xcv3R foi possível detectar *X. campestris* pv. *viticola* em plantas assintomáticas e sintomáticas, coletadas em março de 2007, em Petrolina, PE.

Este método mostrou-se mais eficiente que a detecção direta, ou seja, sem uma etapa de enriquecimento em meio de cultura. Além disso, foi possível reduzir para 72 horas o tempo para detecção e identificação de *X. campestris* pv. *viticola*, tempo reduzido se comparado aos métodos convencionais.

A alta similaridade observada entre as duas patovares, *viticola* e *mangiferaeindicae* de *X. campestris* foi comprovada através da análise de seqüências de nucleotídeos de diferentes regiões genômicas, ITS, 16S rRNA, *hrpB6* e o gene do citocromo “*b561-like*”. Os resultados também sugeriram que as duas patovares estariam mais próximas filogeneticamente a *X. campestris* e *X. axonopodis*. Testes de inoculação cruzada em videira e mangueira mostraram a capacidade de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* de infectar plantas de videira e confirmaram a patogenicidade de *X. campestris* pv. *viticola* à mangueira, quando a inoculação é feita por infiltração foliar. O estudo dos perfis plasmídeos mostrou variabilidade entre as estirpes em relação ao número e tamanho dos plasmídeos, sendo o primeiro relato da presença de plasmídeos em *X. campestris* pv. *viticola*.

## ABSTRACT

---

The bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, causal agent of grapevine bacterial canker, was first detected in Brazil in the irrigated areas of the São Francisco river basin, in Petrolina, State of Pernambuco, in 1998. The disease was also reported in Juazeiro, Bahia and later in the states of Piauí, Ceará, Roraima and Goiás. The use of pathogen-free propagative material has become an important concern, considering the restricted occurrence of this pathogen in the country and the risk of dissemination to other grapevine production regions in the south and southeast of the country.

In order to develop a molecular method for detection and identification of this pathogen, three primers were designed based on the partial sequences of the *hrpB* gene. The primers combinations Xcv1F/Xcv3R and RST2/Xcv3R were tested for specificity and sensitivity in detecting *X. campestris* pv. *viticola* DNA. With the two sets of primers, amplification was positive with all 44 *X. campestris* pv. *viticola* isolates tested, 4 isolates of pathovar *mangiferaeindicae* and 5 of *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. Digestion of PCR products with *Hae*III allowed differentiation of these 3 pathovars. None of the primer pairs were able to amplify grapevine DNA, DNA from 20 non pathogenic bacterium from the grapevine microflora, or DNA from 9 isolates from 7 genera of plant pathogenic bacteria. Sensitivity of the primers Xcv1F/Xcv3R and RST2/Xcv3R was 10 pg and 1 pg of purified *X. campestris* pv. *viticola* DNA, respectively. The detection limit for RST2/Xcv3R was  $10^4$  UFC/ml, but this limit could be lowered to  $10^2$  CFU/ml with a second round of amplification using the internal primer Xcv1F.

The primers were tested for detecting of *X. campestris* pv. *viticola* in grapevine petioles previously inoculated with strain UnB 1186, and although amplification was not possible using extracts of macerated plant tissue, detection was possible using agar plate washes after 72 h of growth, or from a single colony diluted in 200  $\mu$ l of water.

Using Nested-BIO-PCR with two amplification rounds with RST2/Xcv3R and Xcv1F/Xcv3R primers, it was possible to detect *X. campestris* pv. *viticola* in both symptomatic and asymptomatic plants. This method was more effective than a method that employed direct detection from boiled macerated extracts with no previous enrichment on culture medium. The use of BIO-PCR reduced the time needed for detecting and identifying *X. campestris* pv. *viticola* to 72 hours, when compared to more traditional diagnostic methods.

The high similarity observed between the two pathovars of *X. campestris*, *viticola* and *mangiferaeindicae* was confirmed by the analysis of nucleotide sequences from different genomic regions, ITS, 16S rRNA, *hrpB6* and the cytochrome *b561*-like gene. The results also suggested that these two pathovars are phylogenetically related to *X. campestris* and *X. axonopodis*. Cross inoculation tests on grapevine and mango plants inoculation, showed the ability of *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* to infect grapevine and confirmed the pathogenicity of *X. campestris* pv. *viticola* to mango plants, when using the infiltration technique. Plasmid DNA extractions showed variability among strains of the two pathovars in plasmid number and size. This is the first report of plasmid occurrence in *X. campestris* pv. *viticola*.

## CAPÍTULO 1

---

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 1- A CULTURA DA VIDEIRA

Pertencente à família botânica *Vitaceae*, a videira (*Vitis vinifera* L.), é uma das frutíferas mais plantadas no mundo, com uma área aproximada de 10 milhões de hectares, tanto em regiões tropicais como em regiões de clima temperado (Pearson & Goheen, 1998). É cultivada principalmente na Itália, França, Espanha e Turquia e nos Estados Unidos (Pommer & Maia, 2003).

Originária da Ásia e da Europa, a videira foi introduzida no Brasil por volta de 1553, na Capitania de São Vicente, hoje estado de São Paulo, estabelecendo-se alguns anos depois nos estados da Bahia e de Pernambuco (Simão, 1998; Pommer & Maia, 2003), mas desaparecendo durante o século XVII devido, principalmente, à expansão do cultivo da cana-de-açúcar e café. Entre 1830-1840, com o surgimento de novas variedades americanas e a chegada dos imigrantes italianos, a cultura da videira toma novo impulso adquirindo grande importância econômica principalmente no sul do país (Pommer & Maia, 2003).

Segundo Mello (2007), a produção de uvas no Brasil tem apresentado uma tendência crescente, com certa estabilidade nos últimos anos (Tabela 1). No ano de 2004, a área plantada foi de 71.306ha em todo o Brasil. Em 2006, 38,32% da uva produzida no Brasil foram destinados à elaboração de vinhos, sucos, destilados e outros derivados, e 62,68% destinado ao mercado de frutas “in natura” (Mello, 2007).

**Tabela 1.** Produção de uvas no Brasil em toneladas nos anos de 2005 e 2006 por região e principais estados produtores.

Região	Estado	2005	2006
Nordeste	Pernambuco	150.827	155.783
	Bahia	90.988	89.738
Sudeste	Minas Gerais	14.389	12.294
	São Paulo	231.680	194.461
Sul	Paraná	99.253	104.480
	Santa Catarina	47.971	47.787
	Rio Grande do Sul	611.868	623.847
Brasil		1.246.976	1.228.390

Fonte: IBGE e Mello (2007).

No Rio Grande do Sul destacam-se os municípios de Flores da Cunha, Bento Gonçalves, Garibaldi, Santana do Livramento e Caxias do Sul como grandes produtores de vinhos de qualidade. Na produção de uvas finas de mesa, Maringá e Marialva no Norte do Paraná têm merecido destaque na produção das variedades Itália e Rubi. Em São Paulo, destacam-se os municípios de Jales, São Miguel do Arcanjo, Vinhedo e Porto Feliz. A viticultura vem também sendo implementada em vários estados como o Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal, Espírito Santo e Ceará. O município de Pirapora, no Norte de Minas Gerais, no Vale do São Francisco, também começa a surgir como importante pólo produtor de uvas finas de mesa (Mello, 2007).

No Brasil, existem dois grupos de uvas de mesa: uvas finas de mesa, em sua maioria variedades da espécie *V. vinifera* L. (européia), que apresentam bagas grandes e polpa carnosa (por exemplo, as cvs. Itália e Red Globe) e as uvas comuns de mesa, na sua maioria variedades ou híbridas da espécie *V. labrusca* L. (americana), que apresentam bagas médias a grandes, com polpa mucilaginosa. Destacam-se nesse grupo as variedades

Isabel e Niagara. Segundo Camargo & Oliveira (2003), no Brasil, a produção de uvas finas de mesa está concentrada em regiões subtropicais e tropicais (norte do Paraná, São Paulo e no Submédio do Vale do São Francisco).

Segundo Leão & Possídio (2000), as uvas finas de mesa são variedades suscetíveis às doenças fúngicas e altamente exigentes em tratamentos culturais. As uvas comuns de mesa são utilizadas tanto para o processamento quanto para o consumo “in natura”, sendo mais tolerantes às doenças fúngicas e mais adaptadas ao clima frio.

No Nordeste brasileiro, a viticultura data desde o século XVI nos estados da Bahia e Pernambuco. A partir da década de 50 foram introduzidas pela Comissão do Vale do São Francisco, hoje Companhia do Desenvolvimento do Vale do São Francisco (CODEVASF), práticas de cultivo como a poda racional, o desbaste dos cachos, o controle de doenças e o uso de fertilizantes, entre outras. Pode-se dizer que a maior tecnificação da viticultura na região foi alcançada com a implantação dos projetos públicos de irrigação, especialmente dos projetos de Irrigação Senador Nilo Coelho e de Bebedouro, em Petrolina, e dos Projetos Maniçoba e Curaçá em Juazeiro. A partir de 1992, iniciaram-se as exportações de uvas finas de mesa, com auxílio das cooperativas e associações de produtores como a Cooperativa Agrícola de Juazeiro/CAJ bem como a VALEEXPORT (Brazilian Grapes Marketing Board - BGMB) (Leão & Possídio, 2000).

O pólo irrigado no Submédio do Vale São Francisco é responsável por 15 % da produção de uvas finas de mesa do país, correspondendo a 98 % das exportações brasileiras anuais de uva. Dados estatísticos da produção de 2004 indicaram que os estados da Bahia e Pernambuco produziram 150.651 e 83.241 t, respectivamente. Em 2006, houve um aumento expressivo da área plantada no estado de Pernambuco (Mello, 2007). No ano de 2005, a área plantada foi de 4.952 ha e no ano de 2006, foi de 6.471ha, ou seja, um

aumento de, aproximadamente, 30,67 % em relação ao ano anterior. Acredita-se que este aumento se deve aos preços da uva sem sementes no mercado externo e ao apoio tecnológico à produção irrigada de uva na região. Embora ainda predomine o cultivo de uvas finas de mesa, principalmente da variedade Red Globe, o mercado de uvas para vinhos está em plena expansão com o surgimento de diversas vinícolas (Mello, 2007).

No Submédio do Vale São Francisco, a aceleração nos processos fisiológicos e o sucesso no manejo com o uso da irrigação garantem um crescimento rápido dos vinhedos e, após um ano e meio, tem-se a primeira safra (Correia & Silva, 2001). Nessa região, o ciclo de produção gira em torno de 120 dias o que permite até 2,5 safras por ano com produtividade acima da média nacional (Lima *et al.*, 1999a; Correia, 2000; Correia & Silva, 2001).

Segundo Silva & Correia (2001), a viticultura no semi-árido vem se destacando no cenário nacional também pelos altos rendimentos e pela qualidade das uvas produzidas. A cultura da videira destaca-se ainda pela grande importância sócio-econômica para essa região, gerando um grande número de empregos diretos e indiretos, sendo uma das culturas que mais absorve mão-de-obra, empregando 3-4 pessoas/hectare/ano (Lima *et al.*, 1999a; Araújo, 2001). A uva e a manga são as principais frutas exportadas da região do Submédio do Vale São Francisco. Além disso, a uva destaca-se como uma das mais importantes frutas para comercialização no mercado interno que absorve mais de 90% da produção regional (Silva & Correia, 2001).

A cultura da videira está sujeita a diversos problemas fitossanitários, entre os quais, as doenças causadas por fungos, vírus e bactérias. Entre os fungos de importância no Brasil, destacam-se: *Plasmopara viticola* Berl & Toni (míldio), *Uncinula necator* (Shw.) Burril (oídio), *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (mofo cinzento), *Elsinoe ampelina*

(de Bary) Shear (antracnose), *Botryodiplodia theobromae* Pat. (podridão seca ou morte descendente), *Eutypa lata* (Pers. Fr.) Tul. & C. Tul. (eutipa ou declínio), *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *herbemontis* Tocchetto (fusariose) e *Phakopsora euvitis* Ono (Ferrugem da videira) (Amorim & Kunyuki, 1997; Tessmann *et al.*, 2003). Entre os vírus já relatados no Brasil destacam-se: *Grapevine leafroll-associated virus* (enrolamento da folha), *Grapevine fanleaf virus* (clorose infecciosa ou folha em leque), *Grapevine virus A* e *Grapevine virus B* (fendilhamento vertical dos ramos), *Grapevine stem pitting disease* (caneluras do tronco da videira) e *Flesh disease* (mancha ou mosaico das nervuras) (Amorim & Kunyuki, 1997).

No Brasil, apenas três fitobactérias foram relatadas em uva: *Agrobacterium* sp. Conn, isolada por Berian *et al.* (1992) e registrada no Rio Grande do Norte e São Paulo; *A. tumefaciens* (Smith & Townsend, 1907) Conn Biovar 3 (Oliveira *et al.*, 1994) no Estado de Minas Gerais, e mais recentemente, *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* identificada em parreirais nos estados de Pernambuco, Bahia, Piauí, Ceará e Roraima (Malavolta Jr. *et al.*, 1999a; Lima *et al.*, 1999a; Malavolta Jr. *et al.*, 1999b; Freire & Oliveira, 2001; Halfeld-Vieira & Nechet, 2006). Em outros países, outras bactérias já foram descritas: *Xylella fastidiosa* Wells *et al.* (Mal de Pierce), *Xylophilus ampelinus* (Panagopoulos) Willems *et al.* (1987) (queima bacteriana) (Bradbury, 1991), *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend) Conn (galha da coroa), *Agrobacterium vitis* Ophel & Kerr (galha bacteriana do enxerto) e outras três patovares de *X. campestris*, a saber, pv. *vitiscarnosae* (Monis & Patel, 1958) Dye 1978 (hospedeiro *V. carnosae*), pv. *trifoliae* (Padhya, Patel & Kothastane, 1965) Dye 1978 (*V. trifolia*) e pv. *vitiswoodrowii* (Patel & Kulkarni, 1951) Dye 1978, sendo este específico de *V. woodrowii* não infectando *V. vinifera*.

De acordo com a portaria Ministerial nº 180 de março de 1996, publicada no Diário Oficial da União D.O.U. de 25 de março de 1996, são relatadas 221 pragas de importância quarentenária para o Brasil. Segundo a legislação brasileira, pragas A1 são entendidas como aquelas ausentes no país, porém, com características de serem potenciais causadoras de danos econômicos, se introduzidas. Em videira somente *Xylophilus ampelinus* é descrita como praga A1. As pragas quarentenárias A2 são aquelas de importância econômica potencial, mas já presentes no país, em áreas restritas, estando sob programa oficial de controle. Em videira, somente *X. campestris* pv. *viticola* é citada nesta categoria.

No Brasil e, especialmente, no Submédio do Vale São Francisco, até o momento, o cancro bacteriano da videira, causado por *X. campestris* pv. *viticola*, é a bacteriose de maior importância e é o objeto deste estudo.

## **2 - O CANCRO BACTERIANO DA VIDEIRA**

### **2.1 - Histórico e Distribuição Geográfica**

Em 1969, na Índia, Nayudu constatou em plantios de uva da variedade Anab-e-Shahi, uma severa infecção bacteriana, caracterizando-se por apresentar manchas foliares escuras de 1-2 mm de diâmetro, coalescendo para formar manchas maiores; infecção de nervuras e persistência das folhas infectadas na planta, que mesmo secas não se destacavam da haste. Nos ramos e nos pecíolos foram observados cancros alongados de 1-2 cm. A partir de testes bioquímicos e de patogenicidade, esta bactéria foi classificada por Nayudu (1972) como *Pseudomonas viticola* sp. nov., sendo posteriormente reclassificada como *X. campestris* pv. *viticola* por Dye (1978).

No início de 1998, no Brasil, no Submédio do Vale São Francisco, plantas de *V. vinifera* da variedade Red Globe foram coletadas apresentando sintomas nas folhas, nos ramos, nas ráquis e nas bagas. Os sintomas foram constatados, inicialmente, em plantios novos, com 2-3 anos após a enxertia, com incidência de até 100% em Red Globe e nas variedades sem sementes, oriundas de “Thompson Seedless” (Malavolta Jr. *et al.*, 1999b; Lima *et al.*, 1999b). Nas folhas, os sintomas eram caracterizados por lesões escuras, pequenas e angulares, distribuídas de forma esparsa, podendo ocorrer em grande número ao redor das nervuras ou de ferimentos, progredindo para um crestamento e destruição do limbo foliar. Algumas vezes se observa a formação de manchas setoriais muito semelhantes às causadas por *Xylophilus ampelinus*, agente causal da queima bacteriana, doença ainda não constatada no Brasil, de ocorrência no sul da Europa, África do Sul, Turquia e Afeganistão (Lelliott & Stead, 1987). As nervuras principais apresentavam escurecimento e nos ramos, observou-se o escurecimento de extensas áreas, formação de cancos (3 a 5 cm de comprimento) e escurecimento da região vascular que se estendia internamente. Nas bagas eram visualizadas lesões escuras e levemente arredondadas com diâmetro de 1-3mm, semelhantes a cancos. A etiologia do cancro bacteriano foi esclarecida através do isolamento do agente causal, realização de testes bioquímicos e de patogenicidade, através dos quais o agente causal foi identificado como *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Malavolta Jr. *et al.*, 1999b; Lima *et al.*, 1999a). Pelo teste DASIELISA com antissoro específico para *X. ampelinus*, descartou-se a possibilidade de se tratar desta bactéria, uma vez que os resultados foram negativos (Lima *et al.*, 1999a).

Em maio de 1998, lesões características do cancro bacteriano foram observadas em ramos e folhas das variedades Red Globe, Itália e Ribier em cultivos comerciais de *V.*

*vinifera* na região de Teresina-PI. Tratou-se, portanto, do segundo relato deste patógeno no Brasil e o primeiro no Estado do Piauí (Malavolta Jr. *et al.*, 1999b).

Entre 1998 e 1999, o cancro bacteriano já havia sido detectado em parreirais dos municípios de Petrolina e Santa Maria da Boa Vista, no Estado de Pernambuco. Focos da doença também foram detectados na Bahia, nos municípios de Curaçá, Casa Nova, Sento Sé e Juazeiro, nas variedades Festival, Brasil, Benitaka, Patrícia, Piratininga, Ribier, e Catalunha, com incidência bastante variável, sendo que, as variedades Benitaka e Itália mostraram-se mais tolerantes (Lima *et al.* 1999b). Os sintomas causados por este patógeno também foram observados em parreirais mais velhos com incidência variável, sugerindo que neste caso, a transmissão do patógeno possa ter ocorrido através de ferramentas de poda infectadas. Já em 1999, após a ocorrência do período chuvoso o cancro bacteriano foi detectado em mais de vinte novas áreas produtoras de uva da variedade Red Globe com 2,5 a 4 anos de idade (Lima *et al.*, 1999b).

Segundo Nascimento (2000), inspeções de campo no Submédio do Vale São Francisco, realizadas em 2000, detectaram a presença desta bacteriose não só em enxertos suscetíveis como também em porta-enxerto da variedade Tropical 572, uma das mais utilizadas na região.

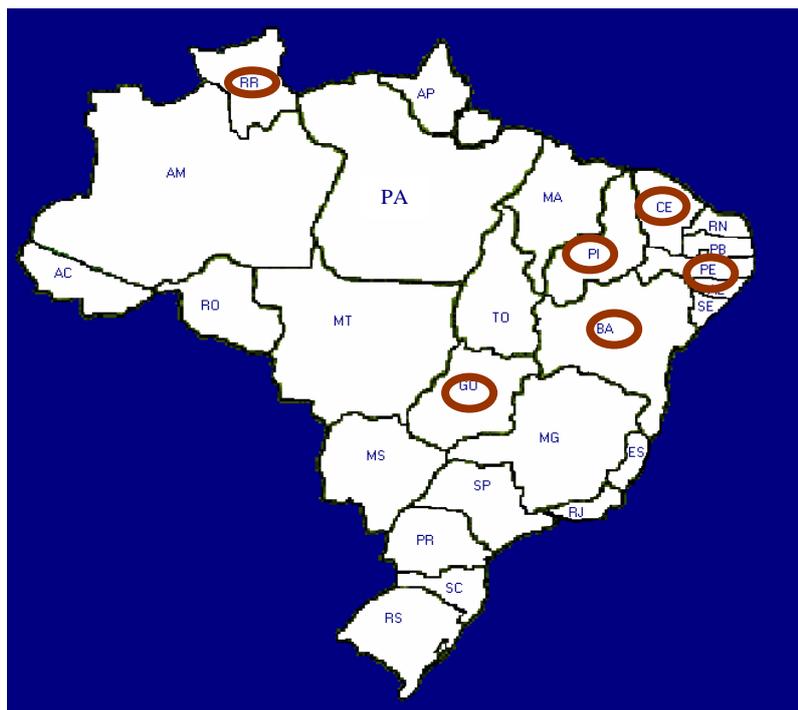
Inspeções realizadas no ano de 2001 no município de Jaguaruana, Ceará, comprovaram a ocorrência do cancro bacteriano nas variedades Red Globe, Flame e Superior (Freire & Oliveira, 2001). Halfeld-Vieira & Nechet (2006) relataram, em julho de 2006, a presença de *X. campestris* pv. *viticola* em parreirais estabelecidos em Boa Vista, Roraima. Os resultados de detecção e identificação foram confirmados por testes bioquímicos e de patogenicidade em videiras das variedades Itália e Niagara Rosada. Os autores relataram que todas as videiras estabelecidas em Boa Vista tiveram o seu material

propagativo oriundo de Petrolina-PE. Durante o mesmo ano, o cancro bacteriano foi relatado em Formosa-GO, em porta enxertos de videira IAC-572 procedentes de Pirapora-MG, que foram eliminados após a confirmação da presença da bactéria (Junqueira *et al.*, 2006). Desde o seu primeiro relato no Brasil, em 1998, a bactéria tem se disseminado pelo país, provavelmente, através de material de propagação infectado (Figura 1).

Acredita-se que o cancro bacteriano estivesse presente no Brasil desde 1996 ou 1997, e que tenha sido introduzida através de material propagativo originário da Índia (Robbs & Rodrigues Neto, 1999; Lima *et al.*, 1999a; Malavolta Jr. *et al.* 1999b; Araújo, 2000) (Figura 1). Estudos realizados por Trindade *et al.* (2005), mostraram que as estirpes brasileiras e o isolado tipo NCPPB 2475, da Índia, são altamente relacionados geneticamente, indicando uma origem comum, em acordo com a hipótese da introdução. Além do Brasil e Índia, a ocorrência da bactéria é citada no leste europeu sob a sigla GVBCD (Grapevine Bacterial Canker Disease) (Kochenko *et al.*,1993).

Os danos causados por essa bactéria na região do Vale São Francisco são significativos, sendo um dos maiores problemas fitossanitários da videira na região. Kisshum & Chand (1990) relataram perdas entre 60 e 80 % da produção em parreirais severamente infectados na Índia. No Brasil, foram relatadas perdas de até 100 ha, sendo 85 % de áreas cultivadas com Red Globe e 15 % das variedades sem sementes originadas de “Thompson Seedless” (Lima *et al.*, 1999b).

Segundo Lopes & Nascimento (2004), a área plantada com Red Globe diminuiu drasticamente desde o aparecimento do cancro bacteriano. Relatos atuais de pesquisadores da Embrapa Semi-Árido, Petrolina-PE, têm mostrado que a presença de *X. campestris* pv. *viticola* mudou a forma de manejo dos parreirais reduzindo para apenas uma única safra por ano (Lima, 2007- comunicado pessoal).

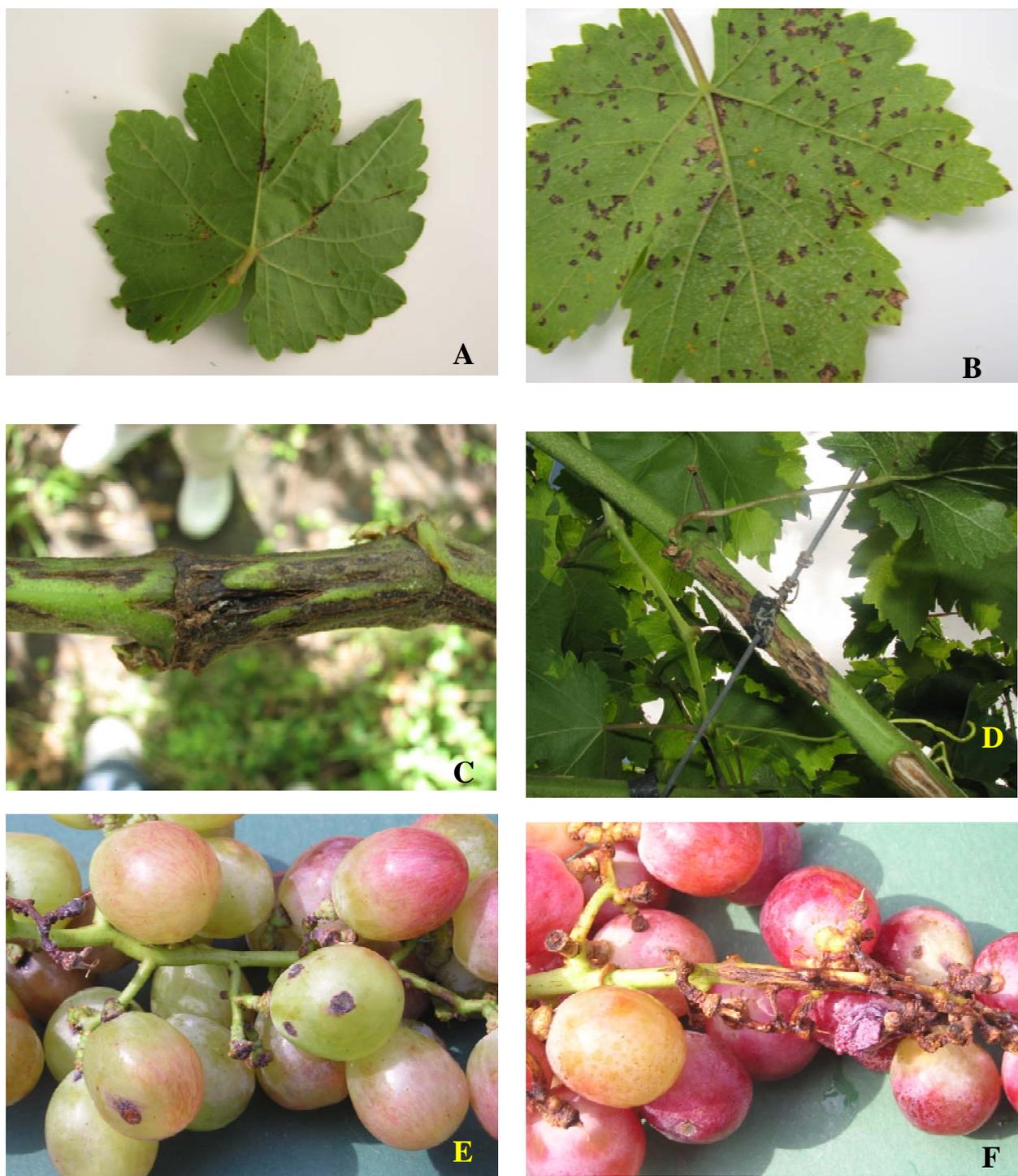


**Figura 1.** Estados onde a ocorrência do cancro bacteriano da videira já foi relatada no Brasil.

## 2.2 – Sintomatologia

Os sintomas da bacteriose no Submédio do Vale São Francisco ocorrem preferencialmente no primeiro semestre do ano, em épocas de chuva, alta umidade relativa e temperatura elevada (Mariano, 2006). Os sintomas surgem inicialmente como pontos necróticos de 1-2 mm de diâmetro, com ou sem halos amarelados, algumas vezes coalescendo e causando a morte de extensas áreas do limbo foliar (Figuras 2A e B). Pode-se observar ainda nas folhas a formação de manchas maiores e sua persistência na planta mesmo depois de secas. Nos pecíolos pode-se observar manchas necróticas e alongadas, formando os cancos. Nos ramos e nas ráquis, ocorre a formação de manchas necróticas alongadas que evoluem para fissuras longitudinais de coloração negra, denominadas cancos (Figuras 2C, D e F). A planta, além de baixa produtividade, pode apresentar sintomas nas bagas caracterizados por manchas cloróticas e necróticas circulares além de desuniformidade na cor e tamanho (Lima *et al.*, 1999a; Malavolta Jr. *et al.*, 1999b; Mariano, 2006) (Figura 2E).

Os sintomas podem variar em intensidade dependendo da cultivar. Segundo Lima *et al.* (1999a) os sintomas foram detectados com incidência variável nas cultivares Itália, Festival, Piratininga, Patrícia, Ribier, Catalunha, Brasil e Benitaka. Segundo Araújo (2001) a cultivar Red Globe e as cultivares sem sementes mostram-se mais suscetíveis quando comparada às demais cultivares utilizadas no Submédio do Vale São Francisco.



**Figura 2.** Sintomas do cancro bacteriano da videira, causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* na cv. Festival (A) e na cv. Red Globe (B, C, D, E e F). A e B- Lesões nas nervuras e manchas foliares; C e D- Cancro nos ramos; E- Lesões necróticas nas bagas; F- Cancro na ráquis.

### 2.3 – Etiologia

O cancro bacteriano da videira é causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye. A bactéria é classificada dentro do Domínio *Bacteria*, Classe *Gammaproteobacteria*, Ordem *Xanthomonadales*, Família *Xanthomonadaceae* e Gênero *Xanthomonas* (Garrity *et al.*, 2001). Inicialmente foi classificada por Nayudu, em 1972, na Índia, como *Pseudomonas viticola* sp. nov. Dye, em 1978, propôs alterações no sistema de classificação e designou a bactéria como *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. Estudos realizados por Vauterin *et al.* (1995), utilizando a técnica de hibridização DNA-DNA, propuseram a reclassificação de várias espécies do gênero *Xanthomonas*. No entanto, *X. campestris* pv. *viticola* não foi incluída neste estudo. Mais recentemente, Takita *et al.* (2004) analisaram a região *rpf*, responsável pela codificação de fatores envolvidos com a regulação e expressão de genes relacionados à produção de enzimas extracelulares e de polissacarídeos, de diferentes espécies e patovares de *Xanthomonas*. Os autores verificaram que a patovar *viticola* não apresentou padrão igual ao de *X. campestris* pv. *campestris*, sugerindo que *X. campestris* pv. *viticola* não pertenceria ao grupo de patovares de *X. campestris*. Sequenciamento de outras regiões, não especificadas pelos autores, mostraram maior similaridade de *X. campestris* pv. *viticola* com *X. axonopodis* pv. *citri*, do que com *X. campestris* pv. *campestris* (Takita *et al.*, 2004). Marques (2007) analisando as seqüências parciais de uma região com alta homologia ao gene *copA*, em algumas estirpes de *X. campestris* pv. *viticola*, identificaram também maior similaridade com a seqüência do gene de *X. axonopodis* pv. *citri* do que com *X. campestris* pv. *campestris*.

Como a classificação a nível específico do agente do cancro bacteriano ainda não foi determinada conclusivamente, optou-se por utilizar neste estudo a nomenclatura

proposta por Dye: *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. Esta bactéria, apesar de pertencer ao gênero *Xanthomonas*, não produz xanthomonadina, conseqüentemente, as suas colônias são apigmentadas. Apresenta células em forma de bastonete, monocapsuladas, uniflageladas, medindo de 1,2 a 2,5 $\mu$ m (Nayudu, 1972). Suas características principais são: colônias arredondadas, convexas, brilhantes e de bordos lisos, oxidativa, com coloração creme-esbranquiçada, gram-negativa, ausência de pigmentos fluorescentes em meio King's B e de atividade de urease e oxidase, não utiliza asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio, ausência de inclusões de poli- $\beta$ -hidroxibutirato e tolerância a concentrações entre 1 e 2 % de NaCl (Lima *et al.*, 1999a). Contudo, segundo Nascimento (2005) *X. campestris* pv. *viticola* cresceu nos meios contendo 1 a 5 % de NaCl e teve crescimento reduzido a partir de 2,5% e letal a 6,0%. A bactéria produz ácidos a partir de glucose, manose, galactose, trehalose, celobiose e frutose (Lima *et al.*, 1999a), entretanto, Malavolta Jr. *et al.* (1999a) não detectaram a produção de ácidos a partir de celobiose. Apresenta crescimento médio (entre 48 e 72 horas) a 28-33 °C, mas não a 41 °C (Malavolta Jr. *et al.*, 1999b; Lima *et al.*, 1999a). Nascimento *et al.* (2005) mostraram que o crescimento ótimo da bactéria ocorreu entre 27 e 29 °C, não crescendo a 0 °C e a 40 °C. Estes dados confirmam os resultados anteriormente descritos pelos mesmos autores. Foi definido também o pH 7,5 como ótimo para o crescimento (Nascimento *et al.*, 2005). A reação de hipersensibilidade é geralmente negativa em folhas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) cultivar White Burley, mas positiva em folhas de tomate variedade Santa Clara (Malavolta Jr. *et al.*, 1999a). Segundo Malavolta Jr. *et al.* (1999a), em testes de patogenicidade os sintomas foram observados oito dias após as inoculações. Plantas da variedade Red Globe apresentaram lesões foliares pequenas, puntiformes e anasarcadas, em grande número. Lima *et al.* (1999a) observaram resultados semelhantes em plantas da

mesma variedade, porém, os sintomas apareceram 12 a 14 dias após a inoculação e variaram de acordo com o método de inoculação utilizado.

## 2.4 - Epidemiologia

Araújo *et al.* (2001), utilizando microscopia eletrônica de varredura, verificaram a presença de *X. campestris* pv. *viticola* no filoplano de videiras indicando sua sobrevivência epifítica. Os autores observaram que as células bacterianas aderem randomicamente às superfícies vegetais, principalmente do limbo foliar, sobre as nervuras e tricomas, por meio de fixação apolar em monocamadas, raramente formando agregados. Essas populações epífitas seriam, em parte, responsáveis pela sobrevivência e manutenção da fonte de inóculo (Araújo, 2001). A formação de exsudatos da bactéria sobre os cancos, bem como a presença latente da bactéria sobre ramos podados ou partes vegetais, como as gavinhas que permanecem aderidas ao aramado da latada podem contribuir como nicho de preservação do inóculo (Araújo *et al.*, 2004).

Nascimento *et al.* (2005) sugeriram que a sobrevivência e recuperação de *X. campestris* pv. *viticola* em folhas de videira herborizadas indicam a sua capacidade de sobreviver em restos vegetais, servindo como fonte de inóculo primário, dentro do parreiral.

Além de infectar naturalmente a videira, *X. campestris* pv. *viticola* também infecta neem (*Azadirachta indica* A. Juss), exibindo sintomas semelhantes àqueles observados em *V. vinifera*, e *Phyllanthus maderaspatensis* L. (*Euphorbiaceae*) na Índia (Desai *et al.*, 1966; Nayudu, 1972). No Brasil, inoculações artificiais de *X. campestris* pv. *viticola* em plantas de neem e representantes da família *Anacardiaceae* como manga (*Mangifera*

*indica* L.), caju (*Anacardium occidentale* L.), umbu (*Spondias tuberosum* Arruda), cajá-manga (*Spondias dulcis* Forst.) e aroeira (*Schinus terebenthifolius* Radii.) resultaram em infecções características do cancro bacteriano (Araújo *et al.*, 1999; Robbs & Rodrigues Neto, 1999; Nascimento *et al.*, 2001). Na região do Submédio do Vale do São Francisco o neem é utilizado como quebra-vento podendo representar uma fonte de inóculo por ser um hospedeiro alternativo de *X. campestris* pv. *viticola*. Entretanto, plantas de neem naturalmente infectadas por *X. campestris* pv. *viticola* ainda não foram encontradas em campo. Moreira *et al.* (2006), em ambiente controlado, não conseguiram recuperar *X. campestris* pv. *viticola* de plantas de neem inoculadas com a bactéria. Inoculações artificiais em plantas de fumo e nove outras espécies de plantas hospedeiras de *Xanthomonas* como, cebola, tomate, beterraba, cenoura, repolho, pepino, soja, feijão e alface não resultaram em sintomas da doença (Braga & Ferreira, 2000). Trabalhos de levantamento do cancro bacteriano em parreirais do Submédio do Vale São Francisco mostraram a presença de bactérias semelhantes à *X. campestris* pv. *viticola* em diversas plantas invasoras: *Alternanthera tenella* (alecrim), *Amaranthus* sp.(caruru), *Glycine* sp.(soja perene), *Senna obtusifolia* (fedegoso) (Peixoto *et al.*, 2007). Em ambiente controlado e utilizando a inoculação artificial, as seguintes espécies de plantas invasoras também reproduziram os sintomas causados por *X. campestris* pv. *viticola*: *Chamaesyce hirta* (burra-leiteira), *Dactyloctenium aegyptium* (capim mão-de-sapo), *Eragrostis pilosa* (capim barbicha-de-leão), *Commelina benghalensis* (trapoeraba) e *Pilea* sp. (brilhantina) (Peixoto *et al.*, 2007).

A bactéria pode ser introduzida em parreirais através de mudas e/ou bacelos infectados e ser disseminada, dentro dos parreirais, em restos de cultura infectados que são deixados no pomar ou ainda, através de tesouras de poda não desinfestadas (Nascimento,

2005). Segundo Robbs & Rodrigues Neto (1999), pus bacteriano, liberados dos cancos, pode constituir a principal fonte de inóculo à média e curta distância, veiculados em gotículas d'água e infectando tecidos suscetíveis que surgem após a poda. A longas distâncias, a bactéria pode ser disseminada por respingos de água de chuva ou de irrigação (Chand *et al.*, 1991), por materiais de propagação, principalmente mudas (Robbs & Rodrigues Neto, 1999) e, eventualmente, por engaços e cachos contaminados (Nascimento, 2005).

A penetração de *X. campestris* pv. *viticola* se dá por aberturas naturais ou micro injúrias nos tecidos ainda verdes do filoplano de plantas de *V. vinifera* (Robbs & Rodrigues Neto, 1999). Foi constatada por Araújo (2001), nos tecidos internos de folhas, ramos e pecíolos lesionados, a presença de massas densas constituídas de células bacterianas nos tecidos do parênquima paliçádico e vascular e do lúmen do xilema. A identificação dessas células como *X. campestris* pv. *viticola* foi confirmada através de imunomarcagem (Araújo, 2001; Araújo *et al.*, 2004).

Nayudu (1972) e Lima *et al.* (1999b) observaram que o período mais favorável ao desenvolvimento da infecção era após as chuvas. Na região Nordeste, esse período corresponde ao primeiro semestre do ano. Portanto, operações que ocasionam ferimentos nas plantas, como desbrota e poda, realizadas neste período em variedades suscetíveis podem propiciar a ocorrência de infecção nas plantas, sendo o período seco a época mais propícia ao manejo da doença.

## 2.5 - Diagnose

A diagnose do cancro bacteriano é feita pela observação e análise dos sintomas, observação do fluxo bacteriano, testes bioquímicos e de patogenicidade quando necessários.

Estudos realizados por Ferreira *et al.* (2000) com o objetivo de identificar e caracterizar isolados de *X. campestris* pv. *viticola* oriundos de Pernambuco e Bahia, coletados entre 1998 e 1999, indicaram tratar-se de um grupo homogêneo em relação às propriedades bioquímicas. Porém, os autores observaram diferenças quanto à reação de hipersensibilidade em folhas de fumo, onde sete estirpes produziram resultado negativo e as demais induziram reação fraca após 72 horas.

Peixoto *et al.* (2006) desenvolveram um meio semi-seletivo, NYDAM (NYDA + ampicilina), para isolamento de *X. campestris* pv. *viticola*. O meio semi-seletivo desenvolvido pelos autores é composto de: extrato de carne, peptona, glicose, extrato de levedura, agar e ampicilina. Os autores verificaram a inibição de saprófitas e o isolamento da bactéria de qualquer parte da planta. No entanto, foi observada uma redução no tamanho das colônias de 2,5 mm para 1,5 mm.

Métodos moleculares e sorológicos podem ser ferramentas adicionais para a diagnose do cancro bacteriano. Anticorpos policlonais desenvolvidos por Araújo *et al.* (2005) mostraram-se reativos e específicos para o uso na detecção de *X. campestris* pv. *viticola*. A sensibilidade de detecção dos dois anticorpos produzidos variou de  $10^4$  a  $10^6$  UFC/ml de diluições equivalentes, embora os autores tenham verificado a existência de reações cruzadas com os patovares: *vesicatoria*, *campestris* e *mangiferaeindicae*, entre 20 e 30 %. Trindade *et al.* (2005) caracterizaram 41 estirpes de *X. campestris* pv. *viticola*

através de rep-PCR (REP, ERIC e BOX-PCR) e observaram a presença de bandas diagnósticas e um padrão de bandas distinto de outras patovares do gênero *Xanthomonas* e espécies utilizadas no estudo. Porém, não foi possível correlacionar os agrupamentos obtidos com rep-PCR com a origem geográfica, variedade ou ano de coleta das estirpes. O fato de não ter sido possível correlacionar, através do estudo das seqüências repetitivas, a origem geográfica dos isolados com os perfis genômicos, pode ser indicativo do baixo controle no trânsito de mudas na região do Vale São Francisco e, conseqüentemente, a alta taxa de disseminação da bactéria entre as áreas produtoras.

## **2.6 – Controle**

Segundo Araújo (2001), as perdas devido ao cancro bacteriano foram estimadas, em 1999, em valores acima de três milhões de reais em 120 ha. Lima *et al.* (1999b) citaram a erradicação de 100 ha de videiras em produção na região do Submédio do Vale São Francisco, sendo 85 % dessa área cultivada com a variedade Red Globe e 15 % com a cultivar Perlette. Considerando-se a natureza da infecção as recomendações de controle baseiam-se principalmente na adoção de medidas preventivas como: estabelecimento de quebra-ventos, inspeções periódicas dos parreirais para detectar a presença de sintomas e a instalação de tapetes de cal virgem ou pedilúvio com amônia quaternária (0,1%) na entrada da área de produção. Além dessas, outras medidas foram recomendadas, tais como: evitar o trânsito de máquinas e equipamentos entre áreas produtoras, proceder a desinfestação das tesouras (poda, raleio e colheita) entre cada duas plantas e utilizar mudas e material propagativo com Certificado Fitossanitário de Origem – (CFO). Para pomares em fase de

implantação recomenda-se evitar o sistema de irrigação sobrecopa, como a aspersão convencional e pivô central, que favorecem a infecção e a disseminação da bactéria.

Para o controle químico recomenda-se pulverizar as plantas com produtos a base de cobre logo após a poda, brotação e quando há a ocorrência de ferimentos, uma vez que, até o momento não há produtos registrados no MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Recomenda-se também evitar a torção de ramos antes da aplicação de cianamida hidrogenada e evitar a aplicação deste produto por meio de pincelamento ou imersão, preferindo pulverização (<http://cpatsa.embrapa.br>; Robbs & Rodrigues Neto, 1999a; Lima *et al.*, 1999). Tem sido observada entre as estirpes de *X. campestris* pv. *viticola* a ocorrência de resistência ao cobre, oxitetraciclina, sulfato de gentamicina, kasugamicina e estreptomicina (Chand *et al.*, 1994; Nascimento *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2000; Araújo, 2001; Araújo *et al.*, 2004). Trabalhos realizados por Araújo (2001) mostraram que diferentes estirpes de *X. campestris* pv. *viticola*, apresentaram variabilidade quanto à tolerância a íons de cobre, sugerindo a ocorrência natural de tolerância nas regiões produtoras, onde o uso de compostos cúpricos é bastante frequente (Araújo, 2001). Trabalhos realizados por Marques (2007) mostraram uma tendência de aumento da tolerância a cobre entre as estirpes brasileiras de *X. campestris* pv. *viticola* ao longo do anos.

Lima & Mashima (2000) relataram que tratamentos químicos de bacelos de videira infectados por *X. campestris* pv. *viticola*, com oxitetraciclina, amônia quaternária, sulfato de cobre, cobre líquido, água quente e cloranfenicol não foram eficazes como tratamentos curativos. Os autores observaram o aparecimento dos sintomas da doença em folhas e pecíolos em todos os tratamentos, porém, mais brandos nos tratamentos com oxitetraciclina e amônia quaternária.

Não existem, até o momento, variedades com resistência genética disponível para os produtores. Chand (1992) nos anos de 1990, 1998 e 1999, em Maharashtra, Índia, mostrou que as cultivares de *V. vinifera* variaram quanto à susceptibilidade, sendo as variedades sem sementes classificadas como suscetíveis e altamente suscetíveis. As cultivares de *V. labrusca* variaram de resistentes a moderadamente resistentes. Aguiar *et al.* (2001), estudando diferentes genótipos de videira quanto à resistência, observaram que *V. shuttleworthii*, var. Seyve Villard (híbrida) e *V. Jacquemonti* apresentavam menor índice de infecção causado pelo patógeno. Os resultados obtidos por infiltração foliar, realizados por Malavolta Jr. *et al.* (2003), mostraram que as variedades Niagara Rosada e Niagara Branca apresentaram os menores índices de severidade de doença, enquanto que as variedades Red Globe, Itália, Benitaka e Rubi apresentaram os maiores índices. Os trabalhos realizados por estes autores indicaram também que além das variedades de *V. vinifera* serem suscetíveis a *X. campestris* pv. *viticola*, os híbridos de videira também podem ser. Os autores sugerem que a resistência apresentada pelas cultivares híbridas (*V. labrusca* x *V. vinifera*), Niagara Rosa e Niagara Branca, seja oriunda de *V. labrusca*, responsável pelos genes de resistência.

De acordo com Lima *et al.* (1999b) as variedades de porta-enxertos IAC 572, 766 e 420A, usados na região do Submédio do Vale São Francisco, não mostraram sintomas quando enxertadas com variedades altamente suscetíveis. Entretanto, em 2000, foi detectada a presença de *X. campestris* pv. *viticola* em porta-enxerto da variedade Tropical 572 (Nascimento, 2000). Lima *et al.* (2000b) também constataram a presença de infecção latente em porta-enxerto assintomático da variedade Tropical 576.

Segundo Lopes *et al.* (2004), experimentos de campo, na estação experimental de Bebedouro, Embrapa Semi-Árido, Petrolina, mostraram que a variedade Perlette foi a mais

suscetível à doença, seguida da variedade Catalunha e Thompson Seedless, Festival e, por último, a Marroo Seedless. Segundo Nascimento (2005), as variedades Isabel e Paulsen 1103, em condições controladas, apresentaram os menores níveis de doença sugerindo o potencial dessas variedades para serem utilizadas em programas de melhoramento genético.

De acordo com a Instrução Normativa nº 9, de 20 de abril de 2006 (MAPA), a variedade Red Globe possui alto grau de suscetibilidade; Thompson, Benitaka, Festival (Superior), Sonaka, Itália e Rubi possuem médio grau, enquanto que, Niagara Rosada e Branca e Princês possuem baixo grau de suscetibilidade.

## JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES

---

O cancro bacteriano é a principal doença bacteriana e fator limitante para a exploração econômica da videira nas regiões semi-áridas do Nordeste brasileiro, no Submédio do Vale do São Francisco.

Atualmente, *X. campestris* pv. *viticola* é regulamentada no Brasil como praga quarentenária do tipo A2, considerando sua ocorrência na região do Submédio do Vale São Francisco nos municípios de Petrolina, estado de Pernambuco e Juazeiro no estado da Bahia (Instrução Normativa n.º. 233 de 07/12/1998 revogada pela IN n.º 9 de 26/04/2006). Deve-se ressaltar que os estados do Piauí, Ceará e Roraima não foram incluídos nesta IN.

É uma exigência do Ministério da Agricultura (IN n.º 9 de 20/04/2006) a certificação de material propagativo garantindo a ausência da bactéria. Nesse contexto, a utilização de técnicas moleculares pode constituir-se em uma ferramenta adicional para detecção e identificação desta bactéria em material vegetal sintomático e/ou assintomático, permitindo maior rapidez na diagnose do cancro bacteriano da videira, e assim, evitar a disseminação da bactéria para as demais regiões produtoras, principalmente, do sudeste e sul do Brasil.

As bactérias *X. campestris* pv. *viticola* e *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* apresentam várias características em comum, tais como: origem geográfica tanto do hospedeiro quanto dos patógenos (primeiros relatos de ocorrência), ausência da xantomonadina (apesar da ocorrência de estirpes pigmentadas de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*), círculo de prováveis hospedeiros comuns, as doenças causadas por essas bactérias são favorecidas pela ocorrência de períodos chuvosos e ambas podem sobreviver epifiticamente sobre os hospedeiros durante o período de seca. Reações

cruzadas em testes sorológicos (Araújo, 2001) e moleculares (Trindade, 2002 e este estudo) sugerem uma proximidade genética entre os dois patógenos. O estudo do relacionamento filogenético entre as patovares *viticola* e *mangiferaeindicae* pode contribuir para o melhor esclarecimento das reações cruzadas observadas em testes diagnósticos e o melhor entendimento da biologia e posição taxonômica dessas duas fitobactérias.

Considerando o exposto acima, as hipóteses a serem testadas neste estudo são:

1- Os genes *hrp* do genoma de bactérias do gênero *Xanthomonas* são altamente conservados, mas, podem ser usados para diferenciar patovares de *X. campestris*. Portanto, oligonucleotídeos iniciadores desenhados baseados nesta região serão específicos para *X. campestris* pv. *viticola*, além de que, estando relacionados à uma região de patogenicidade, oferecem a vantagem adicional de se detectar apenas estirpes patogênicas.

2- O uso de técnicas moleculares, principalmente da PCR, tem mostrado alta eficiência na detecção de fitobactérias em plantas sintomáticas e assintomáticas. Oligonucleotídeos desenhados a partir de uma região do gene *hrpB* serão capazes de detectar por PCR a bactéria em cultura pura e em plantas, com e sem sintomas.

3- As semelhanças observadas entre as duas patovares *viticola* e *mangiferaeindicae* de *X. campestris*, as análises de seqüências parciais do gene *hrpB* e das seqüências repetitivas (rep-PCR) sugerem que estas duas bactérias são filogeneticamente relacionadas e que pertencem à mesma espécie dentro do gênero *Xanthomonas*.

## OBJETIVOS

---

### 1- Objetivo geral

Desenvolver e aplicar um método molecular baseado em PCR para detecção e identificação de *X. campestris* pv. *viticola* em tecidos infectados sintomáticos e assintomáticos de videira.

### 2- Objetivos específicos

(1) Desenvolver e avaliar a especificidade e a sensibilidade de iniciadores específicos para fins diagnósticos, via PCR, em material vegetal infectado;

(2) Desenvolver e validar um protocolo baseado em PCR para a diagnose do cancro bacteriano da videira em materiais vegetais sintomáticos e assintomáticos;

(3) Estudar o relacionamento biológico entre os patovares *viticola* e *mangiferaeindicae* de *Xanthomonas*, através de testes de patogenicidade cruzada em videira e mangueira;

(4) Determinar as relações filogenéticas de estirpes representativas de *X. campestris* pv. *viticola* e *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* através do seqüenciamento das regiões: 16S rRNA, ITS, gene *hrpB6*, citocromo *b561-like* e estudo dos perfis plasmidiais.

## CAPÍTULO 2

---

### DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO MOLECULAR PARA DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *VITICOLA*\*

#### 1- INTRODUÇÃO

*Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye (Nayudu, 1972) (*X. campestris* pv. *viticola*) é o agente causal do cancro bacteriano da videira, a doença bacteriana mais importante em videiras no nordeste brasileiro. Este patógeno foi relatado pela primeira vez nas áreas irrigadas do Submédio do Vale São Francisco em Petrolina, Pernambuco. A doença também foi detectada em Juazeiro, estado da Bahia, no Piauí (Malavolta, Jr. *et al.*, 1999b; Lima *et al.*, 1999a), Ceará (Freire & Oliveira, 2001) e Roraima (Halfeld-Vieira & Nechet, 2006). *X. campestris* pv. *viticola* é uma bactéria gram-negativa, não pigmentada e pode ser diferenciada de outros gêneros bacterianos pelas seguintes características: metabolismo aeróbio, urease e oxidase negativa, catalase positiva, não utiliza asparagina como fonte de carbono, tolera até 2 % NaCl, e produz ácido a partir de glicose, manose, galactose, trehalose, celobiose e frutose (Lima *et al.*, 1999a; Malavolta Jr. *et al.*, 1999b 2 vezes). A doença é identificada a partir do surgimento de pontos de necróticos nas folhas com ou sem halos amarelos, que às vezes coalescem e formam extensas áreas necrosadas. Os sintomas também se desenvolvem nas nervuras das folhas, pecíolos, pedicelos e nas ráquis dos cachos de uva. Normalmente são observados cancos e descoloração vascular nas hastes (Lima *et al.*, 1999a; Malavolta Jr. *et al.*, 1999b).

O manejo integrado do cancro bacteriano pode reduzir perdas e envolve práticas como a utilização de materiais de propagação livres da bactéria, inspeções freqüentes no campo, poda drástica de plantas infectadas, *roguing*, desinfestação dos pneus dos veículos,

\*Trabalho publicado na *Summa Phytopathologica*, vol 33(1), p. 16-23, 2007.

equipamentos e ferramentas de poda, uso de fungicidas protetores como cobre e tiocarbamatos, utilização de quebra-ventos para reduzir a disseminação do patógeno e irrigação por gotejamento (Lima *et al.*, 1999b; Nascimento & Mariano, 2004).

Rotineiramente, a diagnose de doenças de plantas baseia-se na observação de sintomas e, em geral, apenas um número de organismos é considerado como provável agente causal. A diagnose do cancro bacteriano da videira pode ser realizada pela observação dos sintomas em folhas, cachos e hastes, seguido do isolamento em meio de cultura e a identificação da bactéria utilizando um conjunto de testes bioquímicos e nutricionais. A identificação da patovar depende de testes de patogenicidade em variedades suscetíveis de videira que podem consumir de 7-12 dias para o desenvolvimento de sintomas (Lima *et al.*, 1999a; Malavolta Jr. *et al.*, 1999a). O uso de material propagativo livre do patógeno é uma importante medida de controle, uma vez que, a ocorrência da bactéria ainda é restrita a algumas regiões do país e existe o risco de disseminação em mudas ou bacelos para outras regiões produtoras de videiras, principalmente no sul e no sudeste do Brasil.

Detectar e identificar *X. campestris* pv. *viticola* em partes de plantas de videira e material propagativo, sintomático ou assintomático, pode ser uma tarefa demorada com os métodos atualmente disponíveis. Métodos sorológicos e moleculares são mais específicos, sensíveis e podem acelerar o procedimento diagnóstico. Já foram desenvolvidos anticorpos policlonais para *X. campestris* pv. *viticola* (Araújo, 2001) e apesar de ocorrer fraca reação cruzada com *X. campestris* pv. *campestris* e *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*, estes podem ser utilizados potencialmente em testes sorológicos para identificação específica de *X. campestris* pv. *viticola*.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido amplamente utilizada e mostrou ter múltiplas aplicações na diagnose de doenças de plantas (Henson & French, 1993; Martin *et al.*, 2000). O método envolve a amplificação sucessiva de regiões específicas do DNA que podem ser usadas para detectar e identificar o fitopatógeno, incluindo várias bactérias patogênicas de plantas (Schaad *et al.*, 1995; Roberts *et al.*, 1996; Gagnevin *et al.*, 1997; Louws *et al.*, 1999; Pan *et al.*, 1999; Poussier & Luisetti, 2000; Kerkoud *et al.*, 2002, Fatmi *et al.*, 2005; Moltmann & Zimmermann, 2005; Park *et al.*, 2006). Métodos baseados em PCR para detecção de fitobactérias têm muitas vantagens: as bactérias não precisam ser previamente cultivadas em meio de cultura e estes métodos possuem alta sensibilidade para detectar pequenas quantidades de DNA em plantas infectadas ou assintomáticas (Martin *et al.*, 2000).

O desenho de iniciadores específicos para detecção requer a escolha e seqüenciamento de regiões genômicas específicas. Em bactérias fitopatogênicas, foram exploradas várias regiões genômicas para este propósito, como o DNA ribossomal e o *cluster* do gene *hrp* (Louws *et al.*, 1999). Os genes *hrp* foram descobertos e caracterizados em vários fitopatógenos bacterianos e desempenham um papel importante na reação de hipersensibilidade e patogenicidade (Lindgren *et al.*, 1986). Os genes *hrp* têm grande importância na reação de hipersensibilidade em plantas não hospedeiras e reação de patogenicidade em plantas hospedeiras suscetíveis (Chan & Goodwin, 1999). Segundo Chan & Goodwin (1999), a similaridade entre as seqüências das proteínas Hrp de *X. campestris* pv. *vesicatoria* e proteínas de secreção de bactérias patogênicas como *Yersinia* e *Salmonella*, indicam que as proteínas Hrp são parte de um sistema de secreção tipo III necessário para o transporte de fatores de virulência e elicitores de mecanismos de defesa nas plantas, como os produtos do gene *avr*. Os genes *hrp* são altamente conservados na

maioria das patovares de *X. campestris* (Leite Jr. *et al.*, 1994) e podem ser utilizados para diferenciar *Xanthomonas* em nível de espécie e patovar (Destéfano, 2000). Leite Jr. *et al.* (1994b e 1995) desenharam iniciadores específicos baseados na região correspondente ao gene *hrpB* para a detecção e identificação de *X. campestris* pv. *vesicatoria* por PCR. Iniciadores específicos baseados em genes *hrp* são particularmente úteis para detecção de *Xanthomonas*, uma vez que bactérias não patogênicas não possuem esses genes. Roberts *et al.* (1996) também demonstraram que a amplificação e seqüenciamento dos produtos da região *hrp* possibilitou o desenho de iniciadores altamente específicos e com alta sensibilidade para a detecção de *X. fragariae* em plantas de morango sintomáticas e assintomáticas.

A bactéria *X. campestris* pv. *viticola* é considerada um patógeno de importância quarentenária. O desenvolvimento de procedimentos rápidos e seguros para detectar e identificar este patógeno é um passo importante para a diagnose rápida da doença e o manejo da doença no nordeste brasileiro e, ao mesmo tempo, restringir sua possível disseminação no país. O objetivo deste trabalho foi desenvolver oligonucleotídeos iniciadores específicos e avaliar o seu potencial para a detecção e identificação de *X. campestris* pv. *viticola* por PCR.

## **2-MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1-Estirpes bacterianas: origem e manutenção**

Quarenta e quatro estirpes bacterianas oriundas de videira, previamente identificadas como *X. campestris* pv. *viticola*, e o isolado tipo NCPPB 2475 (originário da Índia), foram utilizados neste estudo. Quarenta e duas estirpes de *Xanthomonas* obtidas de diversas plantas hospedeiras, nove estirpes pertencentes a sete outros gêneros e 20 estirpes

não identificadas isoladas de folhas de videira foram incluídas para determinar a especificidade dos iniciadores (Tabela 2). Todas as estirpes foram cultivadas em meio 523 de Kado (Kado & Heskett, 1970). Para preservação a longo prazo, as estirpes foram mantidas em água destilada estéril à temperatura ambiente e em glicerol 30% a  $-80^{\circ}\text{C}$  (Sambrook & Russel, 2001).

**Tabela 2.** Estirpes bacterianas utilizadas neste estudo.

Espécies	Número de estirpes	Hospedeiro de origem
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i>	44	<i>Vitis vinifera</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	01	<i>Daucus carota</i>
<i>Bacillus thuringiensis</i>	01	-
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	02	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	01	<i>Beta vulgaris</i>
<i>Pseudomonas cichorii</i>	01	<i>Lactuca sativa</i>
<i>Pseudomonas corrugata</i>	01	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>Burkholderia cariophylli</i>	01	<i>Dianthus caryophyllus</i>
<i>Ralstonia solanacearum</i>	01	<i>Solanum tuberosum</i>
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	04	<i>Glycine max</i>
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	01	<i>Gossypium hirsutum</i>
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	07	<i>Manihot esculenta</i>
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>	06	<i>Passiflora</i> sp.
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	03	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>ricini</i>	02	<i>Ricinus communis</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>arracaciae</i>	01	<i>Arracacia xanthorrhiza</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	05	<i>Brassica oleraceae</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>carotae</i>	01	<i>Daucus carota</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i>	01	<i>Anacardium occidentale</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i>	03	<i>Mangifera indica</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	03	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	03	<i>Capsicum</i> spp.
<i>X. campestris</i> pv. <i>vitians</i>	01	<i>Lactuca sativa</i>
<i>X. melonis</i>	01	<i>Cucumis sativus</i>
Bactérias epifíticas e/ou endofíticas	20	<i>Vitis vinifera</i>

## 2.2-Extração de DNA

O DNA de folhas de videira foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Doyle & Doyle (1987). Para a extração do DNA bacteriano foi utilizado o método de CTAB de Ausubel *et al.* (1992) com modificações. Foi transferida uma única colônia cultivada em meio sólido 523 de Kado para 1.5 ml de meio 523 líquido. As culturas foram mantidas a 28°C, sob agitação a 150rpm. Após 48 horas, as culturas foram centrifugadas a 4.600 x g (8.000 rpm) por 5 min, o sobrenadante foi descartado e os precipitados ressuspendidos em 520 µl de TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0). Quinze microlitros de SDS 20 % e µl de Proteinase K (20 mg/ml) foram adicionados. A suspensão foi incubada durante 1 hora a 37 °C, então 100 µl de NaCl 5 M e 80 µl de uma solução de CTAB 10 % em NaCl 0,7 M foram adicionados à suspensão. A suspensão foi incubada por 10min a 65 °C e mantida em gelo por 15 min. Um volume igual de clorofórmio: álcool de isoamil (24:1) foi acrescentado à suspensão seguido de incubação em gelo por 5 min. e centrifugação a 7.200 x g (10.000 rpm) por 20 min à temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e adicionou-se 0,6 volume de isopropanol para a precipitação do DNA a -20 °C por 16 horas. Coletou-se o DNA por centrifugação a 7.200 x g (10.000 rpm) por 10 min, lavou-se com 500 µl de etanol 70 % à -20 °C e o precipitado foi seco à temperatura ambiente durante aproximadamente três horas. Finalmente o precipitado foi dissolvido em 50 µl de tampão TE. O DNA foi quantificado em gel de agarose 0.8 %, em 1X TBE, utilizando-se como padrão o marcador DNA do fago λ ( $\lambda$ DNA-*Hind* III) de concentração conhecida. Foram preparadas alíquotas de trabalho na concentração de 50 ng/µl e estas foram armazenadas a -20 °C até serem utilizadas.

### 2.3-Amplificação e seqüenciamento da região *hrpB6* de *X. campestris* pv. *viticola*

Uma região de 840 pb do gene *hrpB6* do genoma bacteriano foi amplificada utilizando-se o par de iniciadores RST2/RST3 (Leite Jr. *et al.*,1994). Cada 25 µl de reação continha: 0,5 µM de iniciadores; 200 µM de dNTPs; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 1X de tampão da *Taq* (20 mM TrisHCl pH 8,4; 50 mM KCl); 1,25 U de *Taq* polimerase e 50 ng DNA molde. As reações foram realizadas em um termociclador PT-100 (MJ Research, Watertown, Mass) usando o seguinte programa: desnaturação inicial a 95 °C por 2 min; 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 62 °C por 1 min, 72 °C por 1 min, e extensão final a 72 °C por 5 min e manutenção das amostras a 4 °C.

Produtos de PCR de três estirpes representantes dos patovares *viticola*, *manihotis* e *mangiferaeindicae* (NCPPB 2475, UnB 1111 e UnB 764, respectivamente) foram obtidos com os iniciadores RST2/RST3, a uma concentração final de 70 ng/µl. Seguido da precipitação com etanol, os produtos de PCR purificados foram seqüenciados de acordo com o procedimento de marcação fluorescente (Dynamic ET Terminator, Amersham Biosciences) na terminação da cadeia (Sanger *et al.*, 1977). As reações de seqüenciamento continham um volume total de 10 µl e incluíam 4 µl do reagente de seqüenciamento, 2 µl dos iniciadores (10 µM), 1 µl do produto de PCR (100 ng) e 3 µl de água estéril. Foram realizados 30 ciclos de amplificação em termociclador Gene Amp PCR System PCR 9700 (Applied Biosystems, E.U.A.): 95 °C por 20 s, 50 °C por 15 s, e 60 °C por 1 min. Cada produto foi purificado utilizando o protocolo de precipitação em etanol e dissolvido em 10 µl de tampão de carregamento (Dyynamic ET) (Pharmacia Biotech, E.U.A.) durante 60min. O seqüenciamento foi realizado em um seqüenciador por capilaridade MegaBace 1.000 –DNA Analyzer System (Pharmacia Biotech, E.U.A.), com as seguintes condições

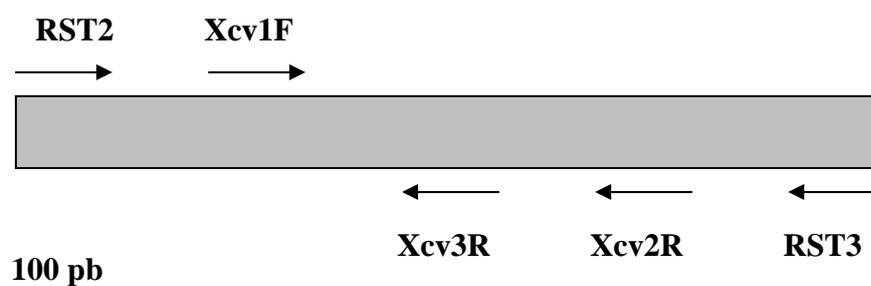
de corrida: voltagem de injeção de 3 KV, tempo de injeção de 60 s e voltagem de corrida de 9 V. As sequências foram analisadas pela conexão eletrônica ao NCBI (National Center for Biotechnology Information – USA) e comparadas utilizando-se o programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990). O alinhamento foi realizado utilizando o programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994).

#### **2.4-Desenho e seleção dos iniciadores**

Os oligonucleotídeos iniciadores candidatos foram desenhados e selecionados utilizando o programa Primer 3 (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, Mass.) (Rozen *et al.*, 2000). Foram desenhados três iniciadores e estes foram testados em cinco possíveis combinações com os oligonucleotídeos iniciadores externos RST2 e RST3 (Figura 3). Os oligonucleotídeos iniciadores foram sintetizados comercialmente pela Invitrogen (Life Technologies, São Paulo). Para a escolha da melhor combinação de iniciadores foram estabelecidos os seguintes critérios: amplificação do produto de tamanho esperado, ausência de bandas inespecíficas, reproducibilidade e amplificação positiva para todas as estirpes de *X. campestris* pv. *viticola* testadas (Tabela 3).

**Tabela 3.** Descrição das possíveis combinações utilizando os iniciadores desenhados neste estudo e os iniciadores RST2/RST3 de Leite Jr. *et al.* (1994a) para a amplificação do DNA de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*.

Combinações de iniciadores	Tamanho esperado pb
Xcv1F /Xcv2R	694
<b>Xcv1F/Xcv3R</b>	<b>243</b>
Xcv1F/RST3	700
<b>RST2/Xcv3R</b>	<b>340</b>
RST2/Xcv2R	750



**Figura 3.** Esquema da posição e orientação dos iniciadores desenhados neste estudo para a amplificação da região *hrpB* de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* utilizando os iniciadores RST2/RST3 de Leite Jr. *et al.* (1994).

## 2.5-Especificidade dos iniciadores

Todas as estirpes bacterianas listadas na Tabela 2 foram utilizadas nos testes de especificidade. Foram selecionados os seguintes pares de iniciadores Xcv1F/Xcv3R e RST2/Xcv3R para os testes de especificidade para *X. campestris* pv. *viticola*. Reações de 12µl foram preparadas contendo: 10 ng de DNA como molde, 100 µM de cada dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5µM de cada iniciador, 1X tampão de PCR (20 mM Tris HCl pH 8,4; 50mM KCl) e 1U de *Taq* polymerase. Todos os testes foram realizados em um termociclador PT 100 (MJ Research, Watertown, Mass.) com um ciclo de desnaturação inicial a 95 °C por 2 min; 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 64 °C por 1 min e 72 °C por 2 min e uma extensão final de 10 min a 72 °C. Os produtos de PCR (volume total da reação) foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1 %, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e visualizados sob luz ultravioleta.

## 2.6- PCR-RFLP

Os produtos da PCR de *Xanthomonas* foram digeridos com a endonuclease *Hae*III (Pharmacia Biotech) para diferenciar as estirpes pertencentes à patovar *viticola* das demais. As digestões foram realizadas em um volume total de 10 µl, contendo: 6 µl do produto de PCR; 1 µl do tampão 10X da enzima e 2U de *Hae*III e a incubação à 37 °C por 16 h. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose 2.5 % ou em gel de poliacrilamida 21 %, à 70 V por 6 horas, corados em brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta.

## 2.7-Sensibilidade dos iniciadores

O limiar de detecção da amplificação do DNA de *X. campestris* pv. *viticola* por PCR foi avaliado utilizando-se diluições em série do DNA genômico purificado das estirpes NCPPB 2475 e UnB 1183 e de uma suspensão de células a  $10^9$  UFC/ml da estirpe NCPPB 2475. De cada suspensão, alíquotas de 2 µl foram adicionados à PCR e alíquotas de 50 µl foram distribuídos em meio 523 de Kado para contagem de colônias. As placas foram mantidas a 28 °C por 48 horas.

## 2.8-Detecção de *X. campestris* pv. *viticola* em tecidos de plantas sintomáticas

Plantas de videira (cv. Perlette) foram inoculadas através de picada nos pecíolos com uma agulha estéril contendo massa bacteriana de uma cultura de 72 horas da estirpe UnB1186. Após 41 dias, foram coletados fragmentos dos pecíolos sintomáticos e usados para detecção por PCR com o par de iniciadores RST2/Xcv3R. Para detectar a presença de *X. campestris* pv. *viticola* nos pecíolos inoculados, foram comparados três métodos: (1) detecção direta macerando-se o tecido em 500 µl de água MilliQ e utilizando-se 1 µl para amplificação por PCR; (2) protocolo de BIO-PCR modificado (Schaad *et al.*, 1995) no qual o extrato do tecido macerado foi riscado em meio 523 de Kado e, depois de 72 horas, as placas de Petri foram lavadas com 1ml de água estéril, e 1 µl do lavado das placas foi utilizado para PCR, e (3) o tecido foi macerado e colocado em meio 523; depois de 72 h uma única colônia suspeita foi coletada em 200 µl de água estéril e 1 µl foi utilizado para PCR.

### 3- RESULTADOS

#### 3.1-Desenho de iniciadores baseados nas seqüências do gene *hrpB6*

A amplificação de uma região do gene *hrpB6* de *X. campestris* pv. *viticola* e de outras *Xanthomonas* foi reproduzível e produziu um *amplicon* de aproximadamente 840pb para todas as estirpes testadas. Os produtos de PCR foram parcialmente seqüenciados e três pares de iniciadores foram testados em cinco combinações com os iniciadores RST2 e RST3. As combinações foram: (1) RST2/Xcv3R; (2) RST2/Xcv2R; (3) Xcv1F/Xcv3R; (4) Xcv1F/Xcv2R, e (5) Xcv1F/RST3 (Figura 4). As combinações (2) e (4) não amplificaram o produto esperado, enquanto que a combinação (5) produziu um fragmento de tamanho esperado (~700pb), mas também várias bandas secundárias inespecíficas. As combinações (1) e (3) amplificaram produtos de aproximadamente 340 e 240pb, respectivamente, com o DNA de *X. campestris* pv. *viticola*, atendendo a todos os critérios previamente estabelecidos. Assim, os dois pares selecionados foram testados, em seguida, quanto à especificidade e sensibilidade.

#### 3.2-Especificidade dos iniciadores

A amplificação foi positiva com o DNA de todas as 44 estirpes de *X. campestris* pv. *viticola*, com os dois pares de iniciadores, RST2/Xcv3R e Xcv1F/Xcv3R. Com as outras espécies de *Xanthomonas*, a amplificação só foi positiva com o DNA de quatro estirpes de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*, sendo três de mangueira e uma de cajueiro, e o DNA de cinco estirpes de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, como observado nos



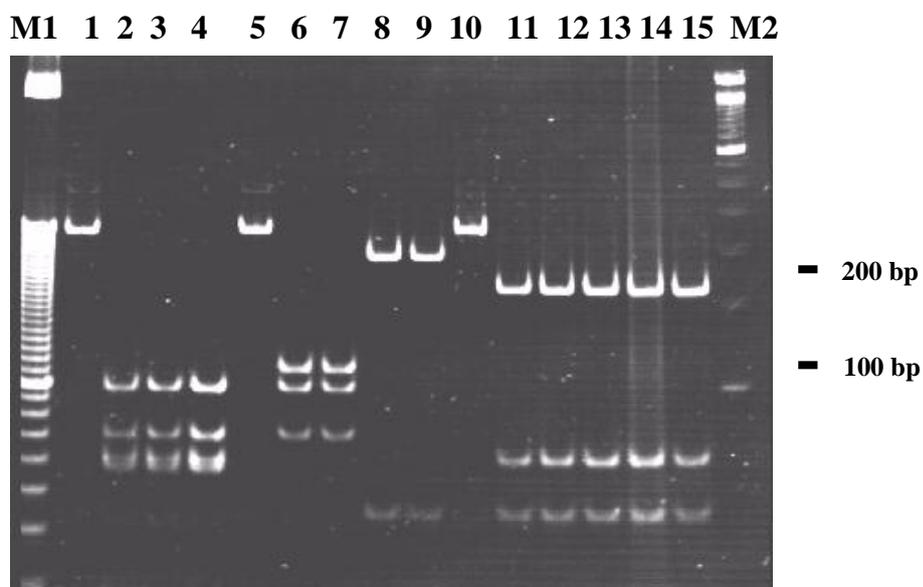
géis de agarose corados com brometo de etídeo (Figura 5). A especificidade de ambos os pares de iniciadores foi testada com o DNA genômico de sete estirpes de diferentes gêneros de bactérias fitopatogênicas, DNA extraído de folhas de videira e um total de 20 bactérias (Tabela 2) epifíticas e/ou endofíticas isoladas de folhas de uva e nenhum produto foi detectado.



**Figura 5.** Especificidade da amplificação por PCR com o par de iniciadores RST2/Xcv3R, visualizada em gel de agarose a 1%. M- 100pb-ladder (GIBCO/BRL); linhas: (1)-NCPPB 2475; (2)- UnB 1186; (3)- UnB 1187; (4)- IBSBF 1369; (5)- UnB 682; UnB 675; (7)- UnB 674; (8)- UnB 684; (9)- UnB 676; (10)- UnB 764; (11)- UnB 769; (12)- IBSBF 1230; (13)- IBSBF 1508; (14)- DNA de folha de videira; (15)- DNA de *Ralstonia solanacearum* e CN- Controle Negativo. Linhas 1-4: *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*; Linhas 5-9: *X. axonopodis* pv. *passiflorae*; Linhas 10-13: *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*.

### 3.3- PCR-RFLP

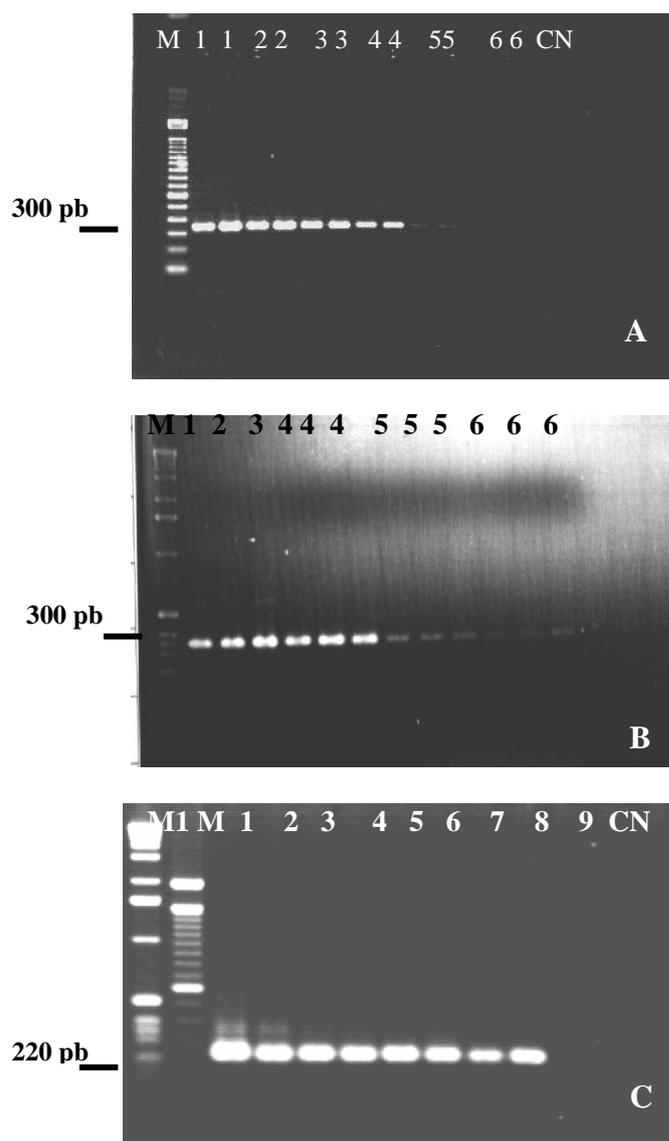
Para diferenciar a patovar *viticola* das duas outras patovares (*mangiferaeindicae* e *passiflorae*) que tiveram amplificação positiva com os dois pares de iniciadores selecionados, foi realizada a digestão dos produtos com a enzima de restrição *HaeIII* (PCR-RFLP). Através da análise em géis de agarose e de poliacrilamida, foi detectado polimorfismo entre as estirpes pertencentes às três patovares. A digestão dos produtos de PCR de *X. campestris* pv. *viticola* produziu cinco fragmentos, com tamanhos aproximados de 100, 70, 60, 55 e 25 pb. As estirpes de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* mostraram dois perfis de restrição distintos e as estirpes de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* tiveram o mesmo perfil com 3 fragmentos de aproximadamente 250, 65 e 45 pb (Figura 6).



**Figura 6.** Digestão com a enzima de restrição *HaeIII* dos produtos de PCR amplificados com os iniciadores RST2/Xcv3R e separados em gel de poliacrilamida a 21 %. M1: 10pb-ladder; M2: 100bp ladder; linhas (1)-NCPPB 2475 – produto não digerido; (2)-NCPPB 2475; (3)- UnB 1186; (4)- UnB 1187; (5)- UnB 764 – produto não digerido; (6)- UnB 764; (7)- UnB 769; (8)- IBSBF 1230; (9)- IBSBF1508 (10)- UnB 682 – produto não digerido; (11)- UnB 682; (12)- UnB 675; (13)- UnB 674; (14)- UnB 684; (15) - UnB 676. Linhas 1 – 4: *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*; linhas 5-9 *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*; linhas 10-15: *X. axonopodis* pv. *passiflorae*.

### 3.4-Sensibilidade dos iniciadores

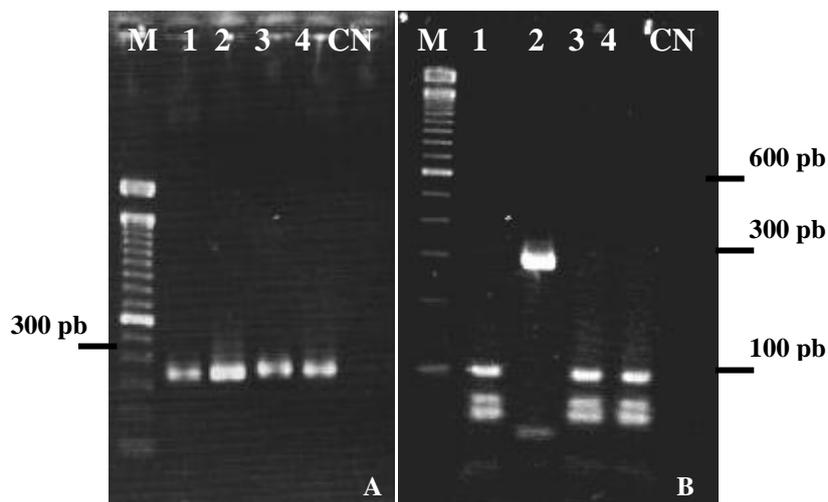
O limiar de detecção para o par de iniciadores Xcv1F/Xcv3R foi de 10 pg com o DNA purificado. O par de iniciadores RST2/Xcv3R foi mais sensível, detectando até 1 pg de DNA bacteriano por reação (Figura 7A). Quando diluições em série de uma suspensão de células bacterianas foram usadas diretamente na reação (de  $10^9$  a  $10$  UFC/ml) foi detectado um produto até  $10^4$  UFC/ml (Figura 7B) que corresponde aproximadamente a 20 células por tubo de reação. Para aumentar sensibilidade, uma segunda rodada de amplificação de PCR foi incluída (Nested-PCR). Uma diluição de 1:50 dos produtos de PCR obtida com os iniciadores RST2/Xcv3R (1º ciclo) foi utilizada para um novo ciclo de amplificação utilizando o iniciador interno Xcv1F e Xcv3R (2º ciclo). Esta técnica aumentou em 100 vezes a sensibilidade, possibilitando a detecção até  $10^2$  UFC/ml (Figura 7C).



**Figura 7.** Limiar de detecção do DNA de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* amplificado com os iniciadores RST2/ Xcv3R. **(A)**- Diluições em série do DNA da estirpe NCPPB 2475. M-100 bp ladder; Linha 1- 10 ng; 2- 1 ng; 3- 0,01 ng; 4- 0,001 ng; 5- 0,0001 ng; 6- 0,00005 ng; CN – Controle Negativo. **(B)**- Diluições em série da suspensão de células da estirpe NCPPB 2475. Linha 1-  $10^9$  UFC/ml; 2-  $10^8$  UFC/ml; 3-  $10^7$  UFC/ml; 4-  $10^6$  UFC /ml; 5-  $10^5$  UFC/ml; 6-  $10^4$  UFC/ml.**(C)**- Nested-PCR com os iniciadores Xcv1F/Xcv3R. Produtos de PCR obtidos com os iniciadores RST2/ Xcv3R (Figura 7B) foram diluídos (1:50) e utilizados em um segund ciclo de amplificação. M1- 1 Kb ladder; M- 100 pb ladder; linha 1-  $10^9$  UFC/ml; 2-  $10^8$  UFC/ml; 3 –  $10^7$  UFC/ml; 4-  $10^6$  UFC/ml; 5-  $10^5$  UFC/ml, 6-  $10^4$  UFC/ml, 7-  $10^3$  UFC/ml, 8-  $10^2$  UFC/ml, 9- 10 UFC /ml; CN- Controle Negativo.

### 3.5 - Detecção de *X. campestris* pv. *viticola* em tecidos de plantas sintomáticas

Como o par de iniciadores RST2/Xcv3R mostrou maior sensibilidade, este foi utilizado para detectar *X. campestris* pv. *viticola* em pecíolos inoculados. A amplificação só foi positiva quando um passo de crescimento ou enriquecimento em meio de cultura foi incluído. Não foi possível detectar a presença da bactéria quando os extratos do tecido macerado eram usados diretamente nas reações, provavelmente, devido à presença de inibidores da PCR. Após o isolamento, foram recuperadas colônias bacterianas de pecíolos sintomáticos, mas nenhuma colônia bacteriana foi recuperada de pecíolos não inoculados ou de pecíolos assintomáticos inoculados. As amplificações foram positivas empregando-se a BIO-PCR modificada e também usando a suspensão de células de uma única colônia suspeita (Figura 8A). A identidade bacteriana foi confirmada pela digestão dos produtos de PCR com a enzima de restrição *HaeIII* que produziu o perfil típico de restrição de *X. campestris* pv. *viticola* (Figura 8B). A observação de aspectos culturais das colônias (morfologia de colônia e ausência de pigmentação amarela), reação positiva ao teste de solubilidade em hidróxido de potássio (3 % KOH), e crescimento negativo em meio de asparagina confirmaram a identificação baseada em PCR.



**Figura 8.** Detecção e identificação de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em pecíolos sintomáticos inoculados. **(A)** Amplificação por PCR com o par de iniciadores RST2/Xcv3R visualizados em gel de agarose 1 %: M- 100 pb-ladder (GIBCO/BRL); linha 1- UnB 1186 (DNA purificado); linha 2- *X.campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 1230 (DNA purificado); linha 3- lavado da placa a partir de tecido macerado após 72 horas de incubação; linha 4- uma única colônia após 72 horas de incubação; CN- Controle negativo. **(B)**- Digestão com a enzima de restrição *HaeIII* dos produtos de PCR amplificados com os iniciadores RST2/Xcv3R e separados em gel de agarose 2,5 %. Mesma seqüência das amostras da Figura 8A.

#### 4- DISCUSSÃO

Os iniciadores desenhados com base no gene de patogenicidade (*hrpB*) e usados juntamente com os iniciadores previamente descritos para *Xanthomonas* (Leite Jr. *et al.*, 1994a), foram capazes de amplificar o DNA de todas as 44 estirpes de *X. campestris* pv. *viticola* testadas. Este grupo de estirpes foi coletado entre 1998 e 2001 em diferentes áreas do Submédio do Vale São Francisco em Petrolina-PE e Juazeiro-BA e de plantas de várias cultivares de videira. Duas estirpes coletadas em Teresina, Piauí, e, a estirpe tipo oriunda da Índia também foram incluídas. A melhor combinação dos iniciadores foi RST2/Xcv3R que produziu um fragmento de aproximadamente 340 pb (tamanho esperado de 344 pb), não amplificaram o DNA da planta hospedeira ou de bactérias presentes na microflora das folhas de videira. Embora estes iniciadores possam ser considerados semi-específicos uma vez que ocorreram ampliações do DNA de duas outras patovares de *Xanthomonas*, *passiflorae* e *mangiferaeindicae*, é improvável que essas patovares sejam encontradas infectando videira em condições de campo. Além disso, o tamanho do produto amplificado é satisfatório para a digestão com enzima de restrição e visualização em géis de agarose, se for necessária a confirmação adicional. Todas as estirpes *X. campestris* pv. *viticola* testadas produziram o mesmo perfil de restrição, sendo distinto dos perfis das patovares *passiflorae* e *mangiferaeindicae*. As relações filogenéticas e taxonômicas entre essas três patovares ainda não foram investigadas. As patovares *viticola* e *mangiferaeindicae* compartilham muitas semelhanças: ambas foram descritas pela primeira vez na Índia, algumas estirpes não produzem o pigmento amarelo (xantomonadina), e apresentam ciclo da doença e epidemiologia bastante semelhantes (Araújo, 2001). A relação entre essas duas patovares

deverá ser estudada mais cuidadosamente para um melhor entendimento das relações filogenéticas entre elas (Capítulo 4).

Baseado nas diluições em séries de DNA purificado, a sensibilidade dos iniciadores RST2/Xcv3R foi de 1pg. O mesmo nível de sensibilidade foi obtido em ensaios de PCR desenvolvidos para *Erwinia amylovora* (Bereswill *et al.*, 1992), e para *Xanthomonas albilineans* (Pan *et al.*, 1999), no entanto para *X. oryzae* pv. *oryzae*, o nível de detecção foi menor que 55 fg de DNA purificado (Sakthiel *et al.*, 2001). A detecção de *X. campestris* pv. *viticola* em suspensões de células foi possível e o número mínimo de células detectadas foi de  $10^4$  UFC/ml. Para aumentar a sensibilidade, foi utilizado o método de nested-PCR com o iniciador interno Xcv1F, que tornou possível a detecção de *X. campestris* pv. *viticola* a partir de uma suspensão de  $10^2$  UFC/ml. Isto correspondeu a menos de uma célula por reação. Níveis de sensibilidade maiores ou menores que 1UFC por reação já foram relatados (Louws *et al.*, 1999). A alta sensibilidade dos iniciadores é um requisito importante para detecção direta em tecidos da hospedeira. Iniciadores com alta sensibilidade podem ser usados para detectar a presença de bactérias em infecções latentes ou em infecções com baixas concentrações do patógeno (abaixo de  $10^5$  UFC/ml) (Bereswill *et al.*, 1992). Outro problema na detecção direta do DNA do patógeno em extratos macerados de tecido da hospedeira é a presença de inibidores de PCR, frequentemente presentes em tecidos vegetais. Isto também foi observado neste estudo. Não foi possível amplificar diretamente o DNA da bactéria em extratos de pecíolos sintomáticos macerados, provavelmente devido à presença de inibidores no tecido. A baixa sensibilidade e os problemas com a presença de inibidores podem ser evitados com a adição de uma etapa de enriquecimento, como a BIO-PCR, que apresenta a vantagem de que só as células viáveis se multiplicam e são detectadas (Schaad *et al.*, 1995). Além disso, a sensibilidade da BIO-

PCR é extremamente alta, em torno de 1-2 UFC/ml (Song *et al.*, 2004). A técnica de PCR pode ser executada a partir de amostras complexas sem a necessidade de obtenção de culturas puras, mas neste estudo foi necessária a adição do enriquecimento para o sucesso da técnica.

O tempo total necessário para a detecção e identificação *X. campestris* pv. *viticola* por PCR foi de 3 a 4 dias, o que foi vantajoso quando se compara às técnicas convencionais (pelo menos 10 dias para isolamento, crescimento, testes bacteriológicos e testes de patogenicidade). Embora PCR seja um método muito útil para diagnose de doenças causadas por vários grupos de patógenos, há algumas preocupações ao se tentar adaptar os protocolos para o uso rotineiro. Problemas potenciais como contaminação, falsos negativos e o alto custo comparado à detecção sorológica, devem ser considerados antes de sua aplicação na rotina ou testes em larga escala (Martins *et al.*, 2000).

Bactérias patogênicas às plantas possuem alta variabilidade e freqüentemente são necessários testes complementares e múltiplos para a identificação definitiva (Alvarez, 2004). Um método de detecção e identificação por PCR poderá ser muito útil como uma ferramenta adicional para monitorar *X. campestris* pv. *viticola* em material vegetal contaminado. Avaliação da sua eficiência para a detecção deste patógeno em diferentes partes da planta, como também em videiras assintomáticas, será o objeto de estudo do próximo capítulo.

## CAPÍTULO 3

---

### DIAGNOSE MOLECULAR DO CANCRO BACTERIANO DA VIDEIRA

#### 1- INTRODUÇÃO

O cancro bacteriano da videira causado pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye foi relatado pela primeira vez nas áreas irrigadas do Submédio do Vale do São Francisco em Petrolina, Pernambuco, em 1998 (Malavolta Jr *et al.*, 1999b; Lima *et al.*, 1999a). A doença também foi identificada em Juazeiro, Bahia, e posteriormente no Piauí (Malavolta, Jr. *et al.*, 1999b), no Ceará (Freire & Oliveira, 2001) e recentemente em Roraima (Halfeld-Vieira & Nechet, 2006). O uso de material propagativo livre do patógeno se tornou uma importante preocupação, uma vez que a ocorrência da bacteriose ainda é restrita a essas regiões no país e existe o risco de disseminação para outras regiões produtoras de videiras no sul e sudeste do Brasil.

A diagnose do cancro bacteriano baseia-se na utilização de um ou mais métodos que incluem: observação dos sintomas característicos, presença de fluxo bacteriano no material infectado, isolamento em meio de cultura específico, testes bioquímicos e reação de hipersensibilidade em tomate e testes de patogenicidade quando necessários.

A doença pode ser identificada a partir do surgimento de pontos de necróticos nas folhas com ou sem halos amarelos que às vezes, coalescem e formam longas áreas necrosadas. Os sintomas também se desenvolvem nas nervuras e pecíolos das folhas, pedicelos e nas ráquis dos cachos. Após 7 a 12 dias da inoculação artificial da bactéria na planta é observado o desenvolvimento de cancos e descoloração vascular na haste (Lima *et al.*, 1999a; Malavolta Jr. *et al.*, 1999a; Araújo, 2001). Araújo (2001) observou a formação de lesões de coloração castanha circundadas por um halo clorótico após sete dias

da inoculação artificial através da infiltração da bactéria na folha de videira. Após 15 dias da inoculação foi observada a formação de cancrios nos ramos, além do crestamento foliar provocado pela coalescência das lesões sugerindo a ocorrência de toxinas produzidas “in situ” pelo patógeno (Araújo, 2001).

A bactéria *X. campestris* pv. *viticola* é gram-negativa, não pigmentada e pode ser diferenciada de outros gêneros bacterianos pelas seguintes características: metabolismo aeróbio, urease e oxidase negativa, catalase positiva, não utiliza asparagina como fonte de carbono, tolera até 2% NaCl, e produz ácido a partir de glicose, manose, galactose, trehalose, celobiose e frutose (Lima *et al.*, 1999a; Malavolta, Jr. *et al.*, 1999b). Trabalhos realizados por Araújo (2001) e Trindade (2002) mostraram também que as estirpes de *X. campestris* pv. *viticola* não cresceram em meio contendo 0,02 % a 0,1 % de TTC (triphenil tetrazolium chloride).

O uso de meios semi-seletivos pode ser uma alternativa para o isolamento de fitobactérias. Peixoto *et al.* (2006) desenvolveram um meio semi-seletivo para *X. campestris* pv. *viticola*, designado NYDAM, composto de extrato de carne, peptona, glicose, extrato de levedura, agar e ampicilina. O meio teve uma eficiência na inibição de 10,8 a 29,4 %, sendo efetivo na redução de crescimento de saprófitas em isolamentos a partir de materiais vegetais naturalmente infectados. Todavia, foi observada também uma redução no tamanho da colônia de 2,5 mm em meio NYDA para 1,5 mm em meio contendo ampicilina. Para fins comparativos e confirmação da identificação da bactéria, os autores recomendam a inclusão de estirpes de referência de *X. campestris* pv. *viticola* e a realização de testes de patogenicidade.

Técnicas moleculares podem ser usadas na detecção e identificação de fitopatógenos com grande eficiência. O uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) tem

proporcionado rápida e precisa detecção de fitobactérias em plantas sintomáticas e assintomáticas. Vários trabalhos têm mostrado o sucesso na utilização de técnicas baseadas na PCR para a detecção e identificação de fitobactérias (Gangnevin *et al.*, 1997, Louws *et al.*, 1999; Schaad *et al.*, 2002; Fatmi *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2007).

Na tentativa de reduzir os problemas na detecção devido à presença de inibidores, Schaad *et al.* (1995) adicionaram uma etapa de enriquecimento da população bacteriana antes da PCR, que incluía o plaqueamento das amostras em meio de cultura. A técnica melhorou a sensibilidade na detecção de *P. syringae* pv. *phaseolicola*, em extratos de sementes de feijão e reduziu o nível de contaminação como também as chances de células inviáveis ou de DNA livre ser detectado. Esta técnica foi denominada BIO-PCR (amplificação biológica e enzimática). O plaqueamento teve vários objetivos, entre eles: (1) reduzir, ou talvez eliminar, a detecção de propágulos inviáveis e DNA livre; (2) eliminar a presença de inibidores que possam estar presentes; e (3) permitir a amplificação biológica do alvo para a amplificação enzimática. A técnica de plaqueamento em agar é muito similar à técnica de enriquecimento em meio líquido, porém em meio sólido a eliminação de inibidores é mais eficiente devido à difusão dos inibidores na matriz do agar (Schaad *et al.*, 1995). A presença de inibidores em extratos de plantas tem sido atribuída a presenças de polissacarídeos (Demeke & Adams, 1992) ou compostos fenólicos, (Minsavage *et al.*, 1994).

Wang *et al* (1999) compararam a eficiência da técnica de PCR e de BIO-PCR com testes de imunomarcção (DIA), sorológicos (ELISA) e técnicas clássicas de isolamento para detecção de *X. albilineans* em suspensões de células e em extratos de folhas de cana-de-açúcar infectadas. Os autores observaram que, para as técnicas de DIA e ELISA, a população da bactéria deveria estar acima de  $10^6$  e  $10^5$  UFC/ml, respectivamente, para

detecção positiva. As quatro técnicas utilizadas pelos autores permitiram a detecção do patógeno em 100 % das amostras de plantas sintomáticas jovens ou adultas. As principais diferenças entre os métodos foram observadas na detecção do patógeno em plantas assintomáticas. O uso da técnica de PCR e BIO-PCR permitiram a detecção do patógeno em plantas assintomáticas, sendo a técnica de BIO-PCR 100 vezes mais sensível que a PCR clássica.

Poussier & Luissetti (2000) desenvolveram iniciadores para a detecção por nested-PCR de biovares de *Ralstonia solanacearum*. Os autores testaram diferentes tratamentos nas amostras para prevenir a presença de inibidores na PCR. Foram adicionados 500mg de BSA (bovine serum albumin) ou a diluição dos extratos de plantas (1:5 até 1:500). Os extratos de plantas foram purificados em membrana de 0,8µm e fervidos em seguida. O tratamento dos extratos das amostras reduziu sensivelmente a quantidade de inibidores com a combinação de 5 % de PVPP e a adição de 500 µg de BSA à PCR, no entanto, a diluição das amostras reduziu a sensibilidade da técnica de detecção.

Sakthivel *et al.* (2001) desenvolveram um protocolo por PCR para detecção de *X. oryzae* pv. *oryzae* em sementes de arroz e em plantas infectadas. O nível de detecção por PCR utilizando os iniciadores desenhados a partir de uma seqüência de inserção IS1113 (TXT e TXT4R) foi de 55 fg de DNA de *X. oryzae* pv. *oryzae*, extraído pelo método CTAB. A técnica de BIO-PCR foi utilizada para a detecção do patógeno em sementes de arroz naturalmente infectadas provenientes de plantas assintomáticas. A técnica permitiu o monitoramento do patógeno em lotes de sementes e pode ser aplicada com a mesma eficiência sem a necessidade de extração de DNA (Sakthivel *et al.* 2001).

Moltmann & Zimmermann (2005) observaram que a adição de uma segunda etapa de amplificação (nested-PCR) aumentou a sensibilidade do método quando comparado à

apenas um ciclo de amplificação na detecção de *X. fragariae* em plantas assintomáticas de morango. Os autores afirmam que o cuidado no preparo das amostras pode reduzir as contaminações no nested-PCR e, conseqüentemente, os falsos positivos.

Fatmi *et al.* (2005) demonstraram que o tempo ótimo para recuperação e identificação de *Xylella fastidiosa* em folhas e pecíolos de videira com sintomas foi pouco variável. Após cinco dias de incubação, 79 % das amostras foram positivas para BIO-PCR.

Segundo Park *et al.* (2007), a eficiência da técnica de detecção via PCR está diretamente ligada à especificidade dos iniciadores bem como as condições de amplificação, amostra, concentração de  $Mg^{2+}$ , termociclador e *Taq* polimerase. Nesse trabalho o DNA de folhas de pimenta, inoculadas artificialmente, foi extraído pelo método de CTAB e usado diretamente na PCR.

*X. campestris* pv. *viticola* é considerado um patógeno de importância quarentenária A2. O desenvolvimento de procedimentos rápidos e sensíveis para detectar e identificar este patógeno é um passo importante para o manejo da doença no Nordeste brasileiro e, ao mesmo tempo, para restringir sua possível disseminação no país. Um método molecular pode se constituir uma técnica adicional aos métodos convencionais de detecção e identificação do patógeno em tecidos de videira sintomáticos e assintomáticos. O objetivo deste trabalho, portanto, foi avaliar e validar um método de diagnose molecular para o cancro bacteriano da videira utilizando PCR com os iniciadores semi-específicos descritos no Capítulo 2.

## 2- MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados diversos experimentos que incluíram a coleta de partes de plantas (frutos, folhas, ramos e pecíolos) naturalmente infectadas das cultivares Red Globe e Festival, em parreirais situados em Petrolina-PE. Foram também coletadas amostras em parreirais com histórico da doença, mas sem sintomas típicos do cancro bacteriano. Paralelamente, foram mantidas em casa de vegetação, na Estação Biológica da UnB, plantas das cvs. Festival e Perlette, artificialmente inoculadas com *X. campestris* pv. *viticola* e plantas livres da bactéria.

Em todos os experimentos foram realizados plaqueamentos dos extratos obtidos de plantas e suspensões bacterianas. Cinquenta microlítros do extrato vegetal ou da suspensão bacteriana foram distribuídos em placas de Petri contendo meio 523 (Kado & Heskett, 1970) e mantidos à temperatura ambiente por 48 horas. A avaliação do plaqueamento consistiu na identificação de colônias características de *X. campestris* pv. *viticola*.

Para a detecção via PCR foram utilizados os seguintes controles:

- Experimento 1: o controle positivo foi constituído por suspensões de células bacterianas da estirpe UnB 1183 obtidas de plantas de videira inoculadas. Os controles negativos foram a água e meio 523 líquido adicionados aos componentes da reação;

- Experimento 2: os controles foram iguais aos usados no experimento 1, no entanto, adicionou-se mais uma amostra de tecido de folha de videira sadia como controle negativo;

- Experimento 3: os controles positivos para cada meio de cultura utilizado consistiram na inoculação do meio com culturas puras obtidas de isolamentos de plantas de

videira inoculadas artificialmente. Os controles negativos foram meio 523, meio 523 e ampicilina e meio NYDAM.

- Experimento 4: como controles positivos foram utilizadas suspensões de células bacterianas isoladas de plantas de videira inoculadas com a estirpe UnB 1183, para o controle negativo foram utilizadas amostras de plantas de videiras, mantidas no laboratório de fitopatologia, não inoculadas.

- Experimento 5: como descrito no experimento 4.

Em todos os experimentos em que foram realizadas a nested-PCR foram incluídos, além do controle negativo da primeira etapa de amplificação, um controle negativo contendo apenas os componentes da reação da segunda etapa de amplificação.

Na avaliação dos resultados para todos os experimentos foram considerados falsos negativos as amostras que, por PCR, não amplificaram o produto esperado, visualizado em gel de agarose para a presença de *X. campestris* pv. *viticola*. Uma vez que todas as plantas sintomáticas coletadas possuíam os sintomas característicos causados pela bactéria, previamente identificados durante a coleta.

### **2.1- Experimento 1 - Detecção de *X. campestris* pv. *viticola* por Nested-PCR em extratos obtidos de tecidos de plantas de videiras sintomáticas e assintomáticas previamente enriquecidos em meio líquido.**

Os trabalhos de detecção e identificação de *X. campestris* pv. *viticola* foram realizados no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Semi-Árido Petrolina-PE, em abril de 2005.

As coletas foram realizadas em parreirais, cv. Festival, de três anos de idade na Fazenda Frutirenda em Petrolina, PE. Foram coletadas amostras de pecíolos, folhas, ramos, ráquis e bagas de videiras. Cada amostra de tecido vegetal foi retirada de uma única planta constituindo cada uma, uma repetição.

Após a coleta, o material foi levado para o laboratório para o processamento e triagem das amostras. Foram coletadas 20 amostras de tecidos de videira com sintomas e 20 sem sintomas, sendo, cinco de cada um dos quatro tipos de material coletado: folhas, pecíolos, ramos e bagas. Um mesmo número de amostras foi coletado e armazenado em câmara fria, para posterior processamento no laboratório de Fitopatologia da UnB.

Os tecidos vegetais foram desinfestados superficialmente e macerados em água estéril. O extrato obtido foi distribuído em meio 523 (Kado & Heskett, 1970) e o restante foi adicionado a 25 ml de meio 523 líquido. Após 16 horas sob agitação a 200 rpm, alíquotas de 10 µl do meio líquido foram utilizadas para PCR (1º ciclo) com os iniciadores RST2/Xcv3R. Os produtos da PCR foram diluídos em água estéril (1:50) para uma segunda etapa de amplificação com os iniciadores Xcv1F/Xcv3R.

As reações de amplificação continham 100 µM de cada dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM de cada iniciador, 1X tampão de PCR (20 mM TrisHCl pH 8,4; 50 mM KCl) e 1U de *Taq* polimerase, 10 µl da amostra para o primeiro ciclo de amplificação e 1 µl de amostra para o 2º ciclo de amplificação. Todos os testes foram realizados em um termociclador PT 100 (MJ Research, Watertown, Mass.) com um passo de desnaturação inicial a 95 °C por 2 min; 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 64 °C por 1 min e 72 °C por 2 min, e um passo de extensão final de 10 min a 72 °C. Os produtos de PCR (volume total da reação) foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1 %, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml).

## **2.2- Experimento 2 - Otimização do tempo de incubação em meio líquido para detecção e identificação de *X. campestris* pv. *viticola* em amostras de videiras sintomáticas e assintomáticas por Nested-PCR.**

Com o objetivo de reduzir as populações de bactérias saprófitas e a presença de inibidores no meio 523 líquido após a inoculação com extratos macerados de plantas, procurou-se determinar o menor tempo de incubação que permitisse a detecção de *X. campestris* pv. *viticola* por PCR e desfavorecesse o crescimento de bactéria saprófitas no meio de cultura. Dez amostras de fragmentos de folhas de videiras, cv. Festival, oriundas de Petrolina-PE, com e sem sintomas, mantidas em câmara fria, foram processadas da mesma forma como descrito anteriormente no item 2.1. Alíquotas de 10µl do meio líquido foram coletadas em diferentes tempos: 3, 6, 9 e 16 horas e utilizadas para o nested-PCR (conforme item 2.1).

## **2.3- Experimento 3 - Avaliação de diferentes meios de cultura na detecção e identificação de *X. campestris* pv. *viticola* em videiras sintomáticas e assintomáticas por PCR.**

Avaliou-se o efeito dos meios líquidos, 523 de Kado e NYDAM (Peixoto *et al.*, 2006), durante nove horas de incubação, na detecção de *X. campestris* pv. *viticola* por PCR.

Todo o material foi processado conforme descrito nos experimentos anteriores (itens 2.1 e 2.2), contudo, a suspensão bacteriana foi adicionada a 25 ml de:

- (a) meio 523 líquido com ampicilina (100 mg de ampicilina/litro de meio);

(b) meio 523 líquido sem ampicilina;

(c) meio NYDA líquido com ampicilina (100 mg/litro de meio) (Peixoto *et al.*, 2006).

Os frascos contendo o meio líquido foram mantidos sob agitação a 29 °C por 9 horas e alíquotas de 10 µl foram coletadas para a realização da nested-PCR.

Paralelamente, adaptou-se e testou-se o método descrito por Elphinstone *et al.* (1996) (citado por Martins, 2000) para detecção direta de *X. campestris* pv. *viticola* sem uma etapa de enriquecimento em meio de cultura. Fragmentos de tecidos de videira foram macerados em 500 µl de TE (pH 7,6) e centrifugados por 2 minutos a 2000 rpm. Em seguida, retirou-se 90 µl do sobrenadante e adicionou-se 10 µl de NaOH 0,5 M. A suspensão foi aquecida a 100 °C por seis minutos e armazenada a -20 °C até o uso.

#### **2.4- Experimento 4 - Detecção de *X. campestris* pv. *viticola* em plantas de videiras inoculadas antes do aparecimento dos sintomas.**

Com o objetivo de avaliar a sensibilidade do método para a detecção de *X. campestris* pv. *viticola* em videiras assintomáticas, plantas de videiras foram inoculadas e avaliadas até o aparecimento dos sintomas.

Quatro plantas de videira da cv. Festival foram inoculadas através do método de pulverização de suspensão bacteriana com a estirpe UnB 1183 de *X. campestris* pv. *viticola*. Este experimento foi realizado em uma câmara de crescimento (incubadora modelo Percivall PT 80) sob condições controladas (29 °C com fotoperíodo de 12 h). Uma planta de videira foi mantida como testemunha, sendo inoculada com água estéril.

A inoculação foi feita borrifando-se a suspensão bacteriana, preparada em tampão fosfato (0,1 M pH 7,0) em todas as folhas de cada planta, as quais foram mantidas em câmara úmida 48 horas antes e 48 horas após a inoculação. A concentração bacteriana foi determinada pela medida da absorbância a 550 nm (Abs = 0,575), que refere-se à concentração de  $2,54 \times 10^8$  UFC/ml em espectrofotômetro digital UV-1203 (Shimadzu Corporation) (Mariano & Silveira, 2005) que foi a concentração da suspensão bacteriana utilizada no experimento.

As plantas inoculadas foram avaliadas coletando-se três folhas por planta aos 3, 5, 7 e 12 dias após a inoculação. O experimento foi realizado duas vezes e as plantas monitoradas até o aparecimento dos sintomas.

#### **2.5- Experimento 5 - Detecção de *X. campestris* pv. *viticola* em videiras sintomáticas e assintomáticas através de BIO-PCR e PCR direta.**

O objetivo deste experimento foi aumentar a sensibilidade do método e reduzir o número de falsos negativos na detecção de *X. campestris* pv. *viticola* comparado com o experimento descrito no item 2.1. De acordo com o exposto acima, foram realizadas as seguintes modificações: (a) as amostras de videira não passaram por nenhum processo de desinfecção superficial; (b) as amostras foram totalmente maceradas em água destilada estéril (0,25 g de tecido vegetal para 1 ml de água destilada) e, (c) para a BIO-PCR foi utilizado meio 523 sólido. As amostras foram também processadas para a PCR direta, pelo método de Elphinstone *et al.* (1996), porém, não foi adicionado NaOH às amostras. Ensaio preliminares mostraram que o uso de NaOH teve efeito inibitório na PCR.

Em março de 2007, em visita realizada à Petrolina, PE, foram coletadas partes de plantas de videira cv. Red Globe incluindo folhas e pecíolos, ramos e bagas, com e sem sintomas típicos do cancro bacteriano da videira, nas seguintes áreas: Área 1 (área de 6 ha com videiras de um ano de idade) e Área 2 (área de 0,7 ha com plantas de oito anos de idade). Cada amostra foi retirada de uma planta diferente, constituindo cada amostra uma repetição.

Foram coletadas 151 amostras de plantas de videiras nas duas propriedades. Na Área 1 foram coletadas: 62 amostras com sintomas e 14 sem sintomas. Das amostras com sintomas 24 eram de ramos, 30 de folhas (incluindo os pecíolos) e oito de cachos. Na Área 2 foram coletadas 61 amostras com sintomas: 27 amostras de hastes, 25 de folhas (incluindo os pecíolos) e 10 de cachos. Em ambas as áreas foram coletadas 14 amostras sem sintomas, sete de folhas e sete de hastes.

As amostras foram previamente processadas no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Semi-Árido. As amostras de hastes e folhas com e sem sintomas foram processadas como descrito no item 2.2. As amostras de cachos coletados foram imersas em 100ml de água estéril por cerca de 24 h. Após esse período, alíquotas de 1,5ml foram retiradas e armazenadas a 4 °C, em geladeira, até o uso.

Cinquenta microlitros do macerado das folhas e das hastes como também dos lavados dos frutos foram distribuídos em meio 523. Após dois dias de crescimento a 28°C, as placas foram lavadas com 1 ml de água estéril e o lavado recolhido em tubos Eppendorf de 1,5ml. Em seguida, fez-se uma diluição de 1:10 de cada lavado para a BIO-PCR. Foram realizadas as ampliações: (1) Nested-PCR com as combinações de iniciadores RST2/Xcv3R (1° ciclo) e Xcv1F/Xcv3R (2° ciclo) e (2) PCR com uma única etapa de

amplificação com os iniciadores Xcv1F/Xcv3R. As condições de amplificação e de eletroforese foram as mesmas descritas no item 2.1.

### **3- RESULTADOS**

#### **3.1. Experimento 1 - Detecção de *X. campestris* pv. *viticola* por Nested-PCR em extratos obtidos de tecidos de plantas de videiras sintomáticas e assintomáticas previamente enriquecidas em meio líquido.**

Os resultados indicaram que *X. campestris* pv. *viticola* pode ser detectada a partir de extratos de tecidos de plantas de videira sintomáticas utilizando um passo de enriquecimento da população bacteriana. As amostras sintomáticas apresentavam sintomas característicos do cancro bacteriano da videira.

A detecção foi considerada positiva para todas as amostras que, em gel de agarose, foi visualizado um produto de aproximadamente 240 pb por nested-PCR, independente da intensidade da banda. Considerou-se como um falso negativo, as amostras que, mesmo apresentando os sintomas característicos de *X. campestris* pv. *viticola*, foram PCR negativo.

A avaliação do plaqueamento foi realizada a partir da identificação de colônias suspeitas de *X. campestris* pv. *viticola* pela análise visual dos aspectos culturais e fenotípicos da colônia, como coloração, brilho, margens e elevação. A maioria das amostras que apresentaram colônias características de *X. campestris* pv. *viticola*, também

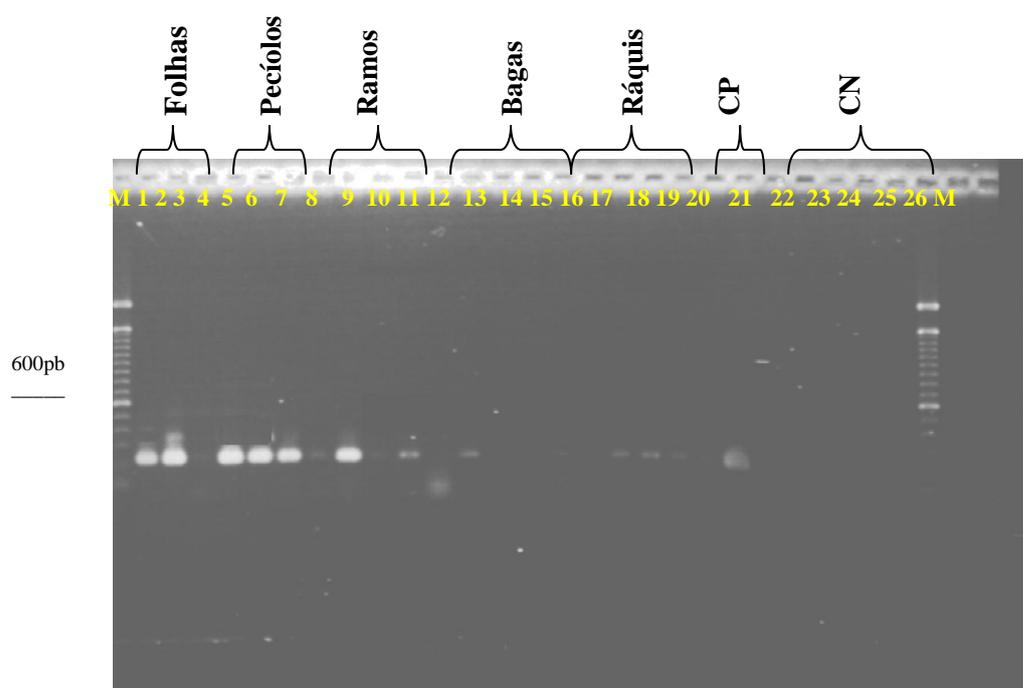
foram positivas por PCR. Entre as 20 amostras sem sintomas analisadas, não foi possível detectar a presença de *X. campestris* pv. *viticola* (Tabela 4).

O teste com amostras de folhas e pecíolos, coletados na mesma região, em experimentos independentes e datas de coletas diferentes foi positiva em 100% dos casos para amostras coletadas em 11/04/2005 utilizando nested-PCR. Na análise das primeiras amostras coletadas, não se observou a presença de falsos negativos para folhas, pecíolos e ráquis (Tabela 4 e Figura 9). Para ramos e bagas foram detectados 25 % e 75 % de falsos negativos, respectivamente.

**Tabela 4.** Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em folhas, pecíolos, ramos e bagas de amostras naturalmente infectadas coletadas em Petrolina-PE e processadas no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Semi-Árido, Petrolina-PE (Data da coleta: 11/04/2005).

Amostra	Com sintomas			Sem sintomas		
	Plaqueamento	Nested-PCR		Plaqueamento	Nested-PCR	
		1° Ciclo	2° Ciclo		1° Ciclo	2° Ciclo
		RST2/Xcv3R	Xcv1F/Xcv3R		RST2/Xcv3R	Xcv1F/Xcv3R
Folha (nervura)	3 <sup>a</sup> / 4 <sup>b</sup>	3 / 4	4 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
Pecíolo	2 / 4	1 / 4	4 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
Ramos	4 / 4	0 / 4	3 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
Baga	1 / 4	1 / 4	1 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
Ráquis	4 / 4	1 / 4	4 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4

<sup>a</sup> Número de amostras de positivas/ <sup>b</sup> Número de amostras processadas.



**Figura 9.** Eletroforese em gel de agarose a 1 % dos produtos de PCR obtidos através de nested-PCR de amostras de videira coletadas em Petrolina, PE. M-Marcador 100 pb DNA ladder (Gibco-BRL); linhas 1 a 4 - amostras de folhas; linhas 5 a 8- amostras de pecíolos; linhas 9 a 12 - amostras de ramos; linhas 13 a 16- amostras de bagas; linhas 17 a 20 - amostras de ráquis, linha 21- controle positivo (suspensão de células obtidas de folha de videira inoculada com *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, UnB 1183); linha 22- controle negativo – água, linha 23- controle negativo- somente meio 523; linha 24 – controle negativo – folha não inoculada; linha 25 –controle negativo do 1º ciclo; 26- controle negativo do 2º ciclo.

Para as amostras de folhas e pecíolos coletados em 25/04/2005, a porcentagem de casos positivos foi de 70 % e 60 % para o nested-PCR, respectivamente (Tabela 5 e Figura 10). Nas amostras de ramos e ráquis a porcentagem de casos positivos foi de 75 % e 100 % na primeira época de coleta, respectivamente. Na segunda coleta todas as amostras de ramos e ráquis foram positivas com o nested-PCR.

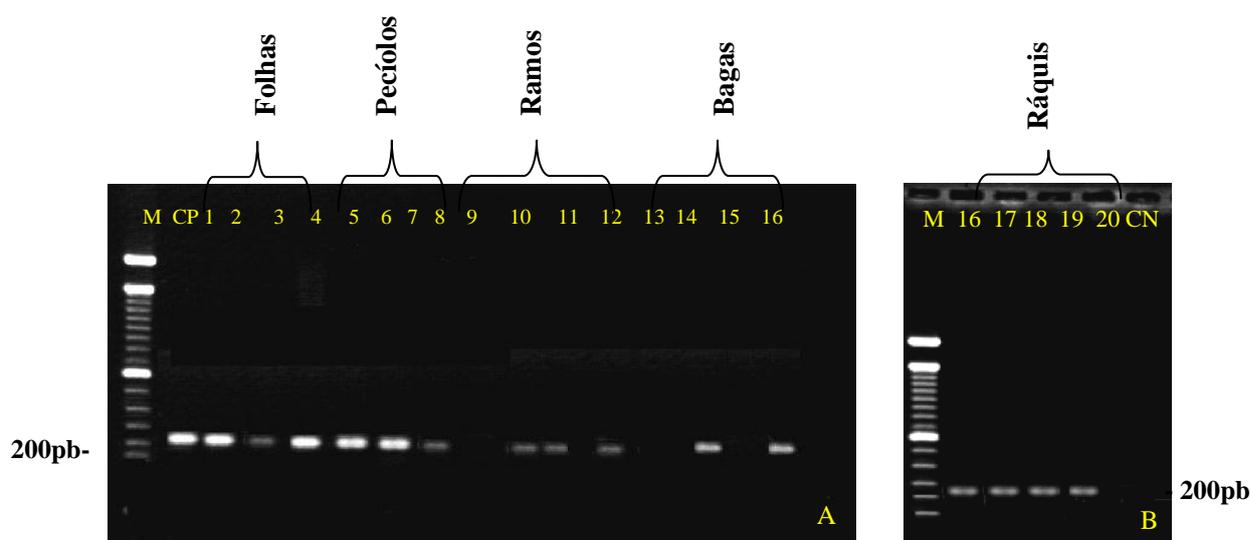
Nas amostras de folhas e pecíolos da segunda época de coleta, detectou-se 30 % e 60 % de falsos negativos, respectivamente, mas não foi detectada a presença de falsos negativos para as amostras de ramos e ráquis (Tabela 5).

**Tabela 5.** Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em folhas, pecíolos e ramos de amostras naturalmente infectadas, coletadas em Petrolina-PE e processadas no laboratório de Fitopatologia da Universidade de Brasília-DF (Data da coleta: 25/04/2005).

Amostra	Plaqueamento	Com Sintomas		Plaqueamento	Sem Sintomas	
		Nested-PCR			Nested-PCR	
		1º ciclo RST2/Xcv3R	2º ciclo Xcv1F/Xcv3R		1º ciclo RST2/Xcv3R	2º ciclo Xcv1F/Xcv3R
Folha <sup>c</sup>	10 <sup>a</sup> / 10 <sup>b</sup>	0 / 10	7 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
Pecíolo	5 / 5	0 / 5	3 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
Ramo	3 / 3	0 / 3	3 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
Ráquis	2 / 2	0 / 2	2 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2

<sup>a</sup>Número de amostras positivas/ <sup>b</sup> Número de amostras processadas.

<sup>c</sup>Sintomas de manchas setoriais e necrose nas nervuras de folhas de videira.



**Figura 10.** Eletroforese em gel de agarose a 1 % dos produtos da PCR obtidos através de nested-PCR das amostras de videira, coletadas em Petrolina, PE e processadas em Brasília, DF. Figura 10A: M- Marcador 100pb DNA ladder (Gibco-BRL); linhas 1 a 4 - amostras de folhas; linhas 5 a 8- amostras de pecíolos; linhas 9 a 12 - amostras de ramos; linhas 13 a 16- amostras de bagas. Figura 10B: linhas 17 a 20 - amostras de ráquis. CN- controle negativo -água e CP - controle positivo (suspensão de células obtidas de folha de videira inoculada com *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* -UnB 1183).

Os resultados apresentados nas Tabelas 3 e 4 mostraram que o tipo da amostra a ser utilizada pode influir diretamente nos resultados de detecção para amostras com sintomas.

As diferenças encontradas entre os resultados de plaqueamento e os resultados da PCR podem estar relacionadas à presença de inibidores no meio de cultura, à presença de bactérias inibidoras do crescimento de *X. campestris* pv. *viticola*, ou mesmo à limitação do reconhecimento visual das colônias.

### **3.2- Experimento 2-. Otimização do tempo de incubação para detecção e identificação de *X. campestris* pv. *viticola* em plantas de videiras sintomáticas e assintomáticas por PCR.**

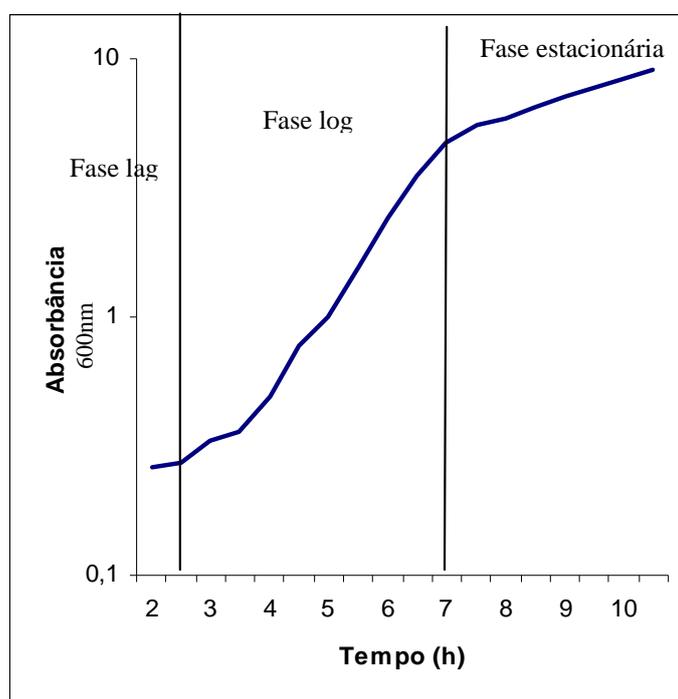
Os resultados mostraram que o tempo influenciou diretamente na sensibilidade do método de detecção. Pode-se observar que a partir de seis horas houve um aumento da sensibilidade do método. Porém, a maior porcentagem de amostras positivas foi obtida após nove horas de incubação, empregando-se o método de nested-PCR. Após este período observou-se uma redução na sensibilidade do método (Tabela 6). Paralelamente foram realizados ensaios para determinação da curva de crescimento da bactéria em meio 523 (Kado & Hesketh, 1970) em função do tempo (Figura 11). Os resultados mostraram que entre três e sete horas a população bacteriana se encontra na fase logarítmica. Após sete horas a população tende a permanecer constante, e entra na fase estacionária.

**Tabela 6.** Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* através de BIO-PCR, com diferentes tempos de crescimento em meio 523 líquido.

Tempo (horas)	Nested-PCR	
	1º Ciclo RST2/Xcv3R	2º Ciclo Xcv1F/Xcv3R
3	0 <sup>a</sup> / 10 <sup>b</sup>	0 / 10
6	0 / 10	1 / 10
9	1 / 10	8 / 10
16	2 / 10	6 / 10

<sup>a</sup>Número de amostras positivas.

<sup>b</sup>Número de amostras processadas.



**Figura 11.** Curva de crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em meio líquido, de Kado & Heskett (1970), em função do tempo, sob condições ideais. Absorbância 600 nm.

### **3.3- Experimento 3 - Avaliação do efeito do meio de enriquecimento na detecção e identificação de *X. campestris* pv. *viticola* em videiras sintomáticas e assintomáticas por PCR.**

Os resultados mostraram que a presença ou ausência de ampicilina (100 mg/L) no meio 523 não influenciou nos resultados de detecção (Tabela 7). Todavia no meio de cultura NYDAM (Peixoto *et al.*, 2006) líquido não foi possível detectar a presença da bactéria mesmo utilizando nested-PCR. A detecção de *X. campestris* pv. *viticola* por PCR direta (fervura em TE sem enriquecimento) foi sensível se comparado ao uso do enriquecimento em meio de cultura. Porém, não foi possível detectar a presença da bactéria utilizando apenas um único ciclo de amplificação. Das dez amostras com sintomas analisadas, 90 % foram positivas para *X. campestris* pv. *viticola* utilizando-se o nested-PCR.

**Tabela 7.** Comparação entre meios líquidos para a detecção via BIO-PCR de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, com tempo de incubação de nove horas.

Meio líquido para enriquecimento	Nested-PCR	
	1º Ciclo RST2/Xcv3R	2º Ciclo Xcv1F/Xcv3R
523 sem ampicilina	0 <sup>a</sup> / 10 <sup>b</sup>	5 / 10
523 com ampicilina (100 mg/L)	0 / 10	5 / 10
NYDA com ampicilina (100 mg/L)	0 / 10	0 / 10

<sup>a</sup>Número de amostras positivas/ <sup>b</sup> Número de amostras processadas.

### **3.4- Experimento 4 - Avaliação da detecção de *X. campestris* pv. *viticola* em plantas de videiras inoculadas antes do aparecimento de sintomas.**

Os resultados mostraram que aos três e cinco dias após a inoculação das plantas não foi possível detectar a presença da bactéria nas folhas das videiras inoculadas, via PCR, tanto pelo método de fervura em TE sem o enriquecimento, quanto pelo método de BIO-PCR. Após sete dias da inoculação, não foram observados sintomas típicos da doença nas plantas, e utilizando-se o método nested- BIO-PCR pode se detectar a presença da bactéria em folhas de videira inoculadas. Doze dias após a inoculação das plantas de videira pode-se observar o aparecimento de pequenas manchas necróticas ao longo da margem do limbo foliar, típicas do cancro bacteriano. Todas as amostras analisadas, aos 12 dias após a inoculação, foram positivas para o método de BIO-PCR e negativas para o método da fervura em TE, sem enriquecimento, seguida de PCR (PCR-direta). Em todos os períodos avaliados, nas plantas testemunhas não foi detectada a presença da bactéria por nenhum dos dois métodos avaliados. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 8.

**Tabela 8.** Avaliação do tempo para detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em plantas de videiras sintomáticas e assintomáticas por PCR.

DAI <sup>a</sup>	Sintomas	PCR- direta	Nested-BIO-PCR
3	-	-	-
5	-	-	-
7	-	-	+
12	+	-	+
42	+	+	+

<sup>a</sup>DAI- Dias após a inoculação

(-) Ausência de sintomas foliares

(+) Presença de sintomas foliares característicos da doença

### **3.5- Experimento 5 - Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videiras sintomáticas e assintomáticas através de BIO-PCR e PCR direto.**

Com a finalidade de validar a metodologia desenvolvida, foi realizada uma visita a duas propriedades em Petrolina-PE e 152 amostras foram coletadas e analisadas por PCR.

Na Área 1, 62 das 76 amostras coletadas apresentavam as seguintes características: manchas necróticas angulares e cancos nos pecíolos; nas hastes pode-se observar a presença de cancos profundos. Pode-se observar a presença de cancro na ráquis e manchas necróticas circulares nas bagas. A presença de colônias suspeitas de *X. campestris* pv. *viticola* em meio de cultura ocorreu em cerca de 60,52 % das amostras. Utilizando a técnica de Nested-BIO-PCR, a bactéria foi detectada em 91,9 % das amostras com sintomas e 78,57 % das amostras sem sintomas. Pelo método de fervura em TE sem enriquecimento em meio de cultura, a bactéria foi identificada em 37,09 % das amostras utilizando-se o nested-PCR. A porcentagem de falsos negativos foi calculada com base no número total de amostras sintomáticas processadas. Utilizando a técnica nested-BIO-PCR não se observou nenhum falso negativo nas amostras de folhas com sintomas. Entretanto, para as amostras de ramos e cachos, com sintomas, observou-se 4,16 % e 50 % de falsos negativos. Todas as amostras de ramos sem sintomas foram positivas por nested-BIO-PCR (Tabela 9).

Na Área 2, as plantas haviam sido podadas 60 dias antes da coleta e apresentavam cachos em formação. As 61 amostras coletadas apresentavam as seguintes características: as folhas com sintomas apresentavam manchas puntiformes, angulares e esparsas, cancos nas nervuras e nos pecíolos; nos ramos pode-se observar a presença de cancos profundos e nos cachos os sintomas estavam presentes principalmente no engaço.

**Tabela 9** Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em folhas, pecíolos, ramos e bagas naturalmente infectadas, coletadas na Área 1 em Petrolina-PE, em março de 2007.

Amostra	Sintomas	Plaqueamento	PCR-direta <sup>d</sup>		BIO-PCR	
			Xcv1R/Xcv3R	Nested-PCR	Xcv1R/Xcv3R	Nested-PCR
Folha	+ <sup>a</sup>	21 <sup>b</sup> /30 <sup>c</sup>	0 / 30	11 / 30	28 / 30	30/30
Ramo	+	17 / 24	0 / 24	12 / 24	23 / 24	23/24
Cacho	+	8 / 8	0 / 8	0 / 8	4 / 8	4 / 8
Folha	-	0 / 7	0 / 7	0 / 7	0 / 7	4 / 7
Ramo	-	0 / 7	0 / 7	0 / 7	0 / 7	7 / 7
<b>TOTAL</b>		<b>46 / 76</b>	<b>0 / 76</b>	<b>23 / 76</b>	<b>55 / 76</b>	<b>68 / 76</b>

<sup>a</sup> Sintomas típicos de cancro bacteriano da videira.

<sup>b</sup> Amostras processadas/<sup>c</sup>Total de amostras analisadas.

<sup>d</sup> PCR-direta – método de fervura da amostra em TE, sem enriquecimento em meio de cultura.

Pode-se observar nesta área que a principal entrada do patógeno foi através dos ferimentos decorridos das podas, torções dos ramos e da desbrota.

A presença de colônias características de *X. campestris* pv. *viticola* em meio de cultura ocorreu em 68 % das amostras (Tabela 10). Utilizando nested-BIO-PCR foi possível detectar a presença da bactéria em 55,7 % das amostras com sintomas e em 7,1 % das amostras sem sintomas. Pelo método da fervura da amostra em TE sem enriquecimento em meio de cultura (PCR-direta) a presença da bactéria foi detectada em 37,7 % das amostras com sintomas apenas por nested-PCR (Tabela 10). Não se detectou a bactéria em nenhuma amostra sem sintomas pelo método do TE. Utilizando a técnica de nested-BIO-PCR nas amostras de folhas, ramos e cachos, com sintomas, foram observados 33,33; 55,55 e 40 % de falsos negativos, respectivamente.

Para a BIO-PCR as amostras foram diluídas a 1:10 devido à alta viscosidade do lavado das placas. As amostras que não foram amplificadas com os iniciadores Xcv1F e Xcv3R, mesmo diluídas 1:10, foram novamente diluídas para 1:100 para uma nova PCR.

Os resultados obtidos pelo método da fervura em TE sem enriquecimento mostraram menor sensibilidade quando comparada à BIO-PCR na detecção de *X. campestris* pv. *viticola*.

**Tabela 10.** Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em amostras de folhas, pecíolos, ramos e bagas naturalmente infectadas, coletadas na Área 2 em Petrolina-PE, em março de 2007.

Amostra	Sintomas	Plaqueamento	PCR-direta <sup>d</sup>		BIO-PCR	
			Xcv1R/Xcv3R	Nested-PCR	Xcv1R/Xcv3R	Nested-PCR
Folha	+ <sup>a</sup>	20 <sup>b</sup> / 24 <sup>c</sup>	0 / 24	10 / 24	15 / 24	16 / 24
Ramo	+	21 / 27	0 / 27	8 / 27	14 / 27	12 / 27
Cacho	+	10 / 10	0 / 10	5 / 10	1 / 10	6 / 10
Folha	-	0 / 7	0 / 7	0 / 7	0 / 7	1 / 7
Ramo	-	0 / 7	0 / 7	0 / 7	0 / 7	0 / 7
<b>TOTAL</b>		<b>51 / 75</b>	<b>0 / 75</b>	<b>23 / 75</b>	<b>30 / 75</b>	<b>35 / 75</b>

<sup>a</sup> Sintomas típicos de cancro bacteriano da videira.

<sup>b</sup> Amostras processadas/<sup>c</sup> Total de amostras analisadas.

<sup>d</sup> PCR-direta – método de fervura da amostra em TE, sem enriquecimento em meio de cultura.

#### 4- DISCUSSÃO

Os resultados confirmaram que os iniciadores RST2, Xcv1F e Xcv3R, descritos no Capítulo 2, podem ser utilizados para a detecção de *X. campestris* pv. *viticola* reduzindo o tempo de detecção da bactéria para até 72 horas, significativamente menor se comparado aos métodos clássicos de detecção.

Diversos ensaios preliminares foram conduzidos durante o desenvolvimento do protocolo com o objetivo de reduzir o tempo necessário para a detecção da bactéria e aumentar a eficiência da técnica. Plantas de videira artificialmente inoculadas e plantas sadias (livres da bactéria) foram mantidas em casa de vegetação para o desenvolvimento dos trabalhos. Em um desses experimentos preliminares, folhas de videira cv. Perlette com sintomas e sem sintomas foram setorizadas, isto é, tiveram as suas folhas divididas em setores e cada setor foi utilizado para detecção, consistindo uma repetição para a BIO-PCR. Porém, mesmo em amostras sintomáticas dependendo do setor utilizado para PCR, o resultado era variável (positivo ou negativo). Houve, portanto, uma grande influência do setor da folha utilizado nos resultados da PCR (dados não mostrados). Diante deste fato, é possível que a distribuição da população bacteriana presente na superfície foliar como também internamente no tecido de videira seja bastante variável, podendo influenciar na capacidade de detecção da PCR. Segundo Araújo (2001), a população de *X. campestris* pv. *viticola* adere randomicamente à superfície foliar por meio de fixação apolar em monocamada, raramente formando agregados, e que a maior frequência dessa adesão ocorre sobre nervuras e tricomas. O autor sugere que, uma vez que a bactéria tenha atingido o sítio favorável, sua habilidade a resistir à remoção constitui vantagem seletiva garantindo a estabilidade da população residente. As bactérias gram-negativas interagem com a superfície vegetal formando biofilme ou pequenos agregados e a interação entre

essas e a superfície do hospedeiro ocorre pela presença de adesinas, incluindo, polissacarídeos e proteínas (Fuqua, 2007). É provável que a presença de polissacarídeos na superfície foliar poderia estar influenciando os resultados da PCR.

Testes também foram realizados para o desenvolvimento de um controle interno da reação. O uso de controle interno na PCR tem como finalidade assegurar a confiabilidade dos resultados, eliminando a possibilidade de falsos negativos. Nestes ensaios foi utilizado o par de iniciadores ITS1/ITS4 para *Colletotrichum gloesporioides*. Os resultados mostraram que os iniciadores RST2, Xcv1F e Xcv3R não amplificavam o DNA do fungo e os iniciadores ITS1/ITS4 não amplificavam o DNA da bactéria, no entanto, os resultados não foram reproduzíveis (dados não mostrados).

Segundo Louws *et al.* (1999) a determinação da presença de falsos positivos e falsos negativos é de extrema importância no desenvolvimento de protocolos de detecção. Os falsos positivos podem ocorrer devido à amplificação cruzada; presença de DNA exógenos de células ou aerossóis e pela presença de DNA contaminante (contaminação pré-existente). A presença de um controle negativo em cada experimento é de essencial importância. Os falsos negativos podem ocorrer devido à presença de compostos que inibem a PCR, degradação da sequência alvo ou problemas com os reagentes da reação (Louws *et al.*, 1999). Em todos os experimentos foram incluídos controles negativos que pudessem indicar a ocorrência de contaminações e, de acordo com os resultados, não se constatou a ocorrência de falsos positivos. Já a ocorrência de falsos negativos foi considerada nos experimentos, uma vez que uma porcentagem das amostras com sintomas característicos do cancro bacteriano apresentaram resultado negativo para PCR, ao contrário do esperado. Os controles positivos incluídos em todos os experimentos apresentaram resultados positivos, conforme o esperado.

Com relação aos resultados obtidos nos experimentos 1, 2 e 3 pode-se verificar que o enriquecimento da população bacteriana em meio líquido antes da PCR propiciou a detecção da bactéria em um número maior de amostras, comparado as amostras que não foram submetidas ao enriquecimento. Os resultados obtidos pelo experimento 1, mostraram que 100% das amostras de folhas e pecíolos, com sintomas, processadas logo após à coleta foram positivas para a presença de *X. campestris* pv. *viticola*, não ocorrendo falsos negativos. Para as amostras de folhas e pecíolos, com sintomas, coletadas e processadas cerca de oito dias após a coleta ocorreram em média 35% de falsos negativos para folhas e pecíolos. A presença de falsos negativos pode estar relacionada à composição do meio de cultura, à presença de inibidores de PCR oriundos das amostras como, por exemplo, os polissacarídeos (Demeke & Adams, 1992) ou compostos fenólicos (Minsavage *et al.*, 1994), ou devido à presença de população de bactérias saprofíticas de crescimento mais rápido que o de *X. campestris* pv. *viticola*, ou ainda, pela baixa população bacteriana alvo.

Não foi possível detectar a presença da bactéria utilizando apenas um ciclo de amplificação no experimento 1. Provavelmente, isto se deve ao fato de que o meio 523 de Kado & Heskett (1970), é um meio de cultura extremamente rico e conseqüentemente pode ter influenciado no aumento da síntese de polissacarídeos desta e de outras bactérias reduzindo a sensibilidade do método de detecção por PCR. Segundo Demeke & Adams (1992), a presença de polissacarídeos pode inibir a PCR. A utilização de mais um ciclo de amplificação reduziu os falsos negativos e melhorou sensivelmente a sensibilidade do método.

No experimento 2 a utilização do meio semi-seletivo NYDAM (Peixoto *et al.*, 2006) não permitiu a detecção de *X. campestris* pv. *viticola* em folhas quando comparado

ao uso de meio 523 com e sem ampicilina. Estudos realizados por Moura & Romeiro (1998), sugerem que um meio que restringe o crescimento de microrganismos saprofíticos geralmente inibem o crescimento do patógeno alvo. Nos trabalhos realizados por Peixoto *et al* (2006), foi relatado uma redução no tamanho das colônias de *X. campestris* pv. *viticola*, em NYDAM, de 2,5 mm para 1,5 mm de diâmetro.

A partir dos resultados obtidos com os experimentos 1, 2 e 3 sugere-se que o período entre a coleta e o processamento das amostras bem como o tempo de incubação em meio líquido estariam relacionados à eficiência de detecção da bactéria via PCR. Uma vez que foi observado, em meio líquido, que a partir de 9 horas a população de *X. campestris* pv. *viticola* tem seu crescimento cessado devido a falta de alguns nutrientes ou, com menos frequência, pela presença de produtos tóxicos.

Os resultados observados no experimento 4 indicaram que, sete dias após a inoculação, foi possível detectar *X. campestris* pv. *viticola* em plantas de videira assintomáticas, utilizando nested-BIO-PCR. Porém, não foi possível detectar a presença da bactéria em tecidos assintomáticos pelo método de PCR-direta. Os resultados sugerem que a baixa população bacteriana de *X. campestris* pv. *viticola* e a presença de inibidores da PCR presentes sejam os responsáveis pelos falsos negativos detectados.

Fatmi *et al.* (2005) não detectaram a presença de *Xylella fastidiosa*, em plantas assintomáticas de citrus e videira com apenas uma etapa de amplificação sendo necessária a etapa de enriquecimento em meio de cultura para a detecção da bactéria.

No experimento 5, a porcentagem de falsos negativos detectados nas amostras de folhas, ramos e cachos, com sintomas, coletadas na Área 2, foi de 33, 55 e 40 %, respectivamente, pelo método de nested-BIO-PCR. Na Área 1 a porcentagem de falsos negativos foi de 4 e 50 % para ramos e cachos, respectivamente com o mesmo método.

Não foram detectados falsos negativos nas amostras de folhas da mesma área. As diferenças encontradas quanto à presença de falsos negativos podem estar relacionados à idade da planta hospedeira. Os parreirais da Área 1 tinham um ano de idade e os da Área 2, oito anos. Portanto, é possível que a idade dos parreirais tenha influenciado na detecção de *X. campestris* pv. *viticola*. O sucesso da amplificação também parece depender do estágio de desenvolvimento da planta, condições fisiológicas ou do tipo de tecido a ser analisado (Louws *et al.*, 1999). Na área 2, as plantas de videiras estavam em fase de formação de cachos, mas não na área 1. Segundo Dias (2006), durante a fase de desenvolvimento vegetativo da videira, diversos ácidos e açúcares são acumulados nas partes verdes da planta e na fase de maturação são transportados para as bagas. Durante o processo de maturação da videira ocorrem vários processos: acúmulo de açúcares, diminuição dos teores de ácidos, migração de materiais minerais, modificação das paredes celulares, aumento das substâncias azotadas, compostos fenólicos e substâncias aromáticas. Os resultados obtidos no experimento 5, utilizando meio 523 sólido, indicaram que foi possível detectar a bactéria, em plantas sintomáticas, com os iniciadores Xcv1F/Xcv3R em um único ciclo de amplificação e, que com a utilização de nested-BIO-PCR, a sensibilidade do método foi aumentada em cerca de 5 %, e o número de falsos negativos reduzidos. Segundo Schaad *et al.* (1995), o princípio de enriquecimento em meio líquido é similar ao plaqueamento em meio sólido, no entanto, em meio sólido a remoção dos compostos inibidores é mais eficiente devido à difusão desses componentes pela matriz do ágar.

O uso de meio sólido no protocolo para detecção de *X. campestris* pv. *viticola* melhorou consideravelmente a sensibilidade da técnica de PCR possibilitando a detecção da bactéria com uma única etapa de amplificação com o par de iniciadores Xcv1F/Xcv3R,

para amostras com sintomas e, também por nested-BIO-PCR para amostras sem sintomas. Portanto, o uso do enriquecimento em meio sólido 523 de Kado, possibilitou a detecção do patógeno em 56 % e 73 % do total de 123 amostras, utilizando apenas um ciclo de amplificação de PCR ou Nested-BIO-PCR, respectivamente. As diferenças ocorridas entre a análise visual das colônias e os resultados do PCR podem estar relacionadas com a identificação incorreta da colônia, a dificuldade em se remover a célula bacteriana do tecido vegetal ou devido ao excesso de células bacterianas utilizadas na PCR. É possível que as diluições de 1:10 ou 1:100 feitas não tenham sido suficientes para o sucesso da técnica. Segundo Peixoto *et al.* (2006) o isolamento de *X. campestris* pv. *viticola* a partir de órgãos vegetais é muitas vezes dificultado pela presença de bactérias saprófitas, destacando-se uma bactéria classificada como *Microbacterium barkeri* [(Collins *et al.* (1983) Takeuchi & Hatano (1998)], de crescimento inicial esbranquiçado, tornando-se, logo em seguida, amarela. No presente estudo, a avaliação do plaqueamento foi realizada 48 horas após a distribuição dos extratos das amostras, sendo imediatamente realizada a lavagem da placa para os procedimentos de PCR, como descrito no Capítulo 2.

A nested-BIO-PCR também foi eficiente na detecção de *X. campestris* pv. *viticola* em 35,71 % das folhas e 50 % dos ramos de videiras assintomáticas amostradas nas duas propriedades (Tabelas 8 e 9). Os resultados indicaram que para a detecção de *X. campestris* pv. *viticola* em plantas assintomáticas, o uso dos ramos como amostra, foi o mais eficiente.

Apesar da técnica de PCR-direta, sem a etapa de enriquecimento, permitir detectar e identificar a bactéria em um tempo menor quando comparada à técnica de BIO-PCR esta pode apresentar a desvantagem de detectar o DNA livre da bactéria e células bacterianas inviáveis. Este método resultou em baixa sensibilidade para plantas sintomáticas e nenhuma sensibilidade para plantas assintomáticas. Das amostras das duas áreas analisadas

por PCR-direta com apenas um ciclo de amplificação com os iniciadores Xcv1F/Xcv3R, não foi detectada a presença da bactéria em nenhuma amostra assintomática analisada. A baixa sensibilidade verificada pode estar relacionada à presença de inibidores ou à baixa população bacteriana no tecido vegetal, menor que  $10^2$  UFC/ml, limiar de detecção do nested-BIO-PCR, determinado no Capítulo 2. Diversos componentes de plantas podem agir como inibidores de PCR tais como os polissacarídeos (Demeke & Adams, 1992) ou componentes fenólicos, como o tanino (Minsavage *et al.*, 1994) e o hidróxido de cobre na superfície das folhas (Louws *et al.*, 1999). O pré-tratamento dos tecidos de plantas utilizando PVPP aumentou significativamente a sensibilidade da técnica utilizando nested-PCR para a detecção de *Ralstonia solanacearum* sem a necessidade de enriquecimento em meio de cultura (Poussier & Luisetti, 2000). É possível que o pré-tratamento das amostras de tecidos de videira possa aumentar a sensibilidade da metodologia e que esta baixa sensibilidade também esteja relacionada aos iniciadores desenhados e utilizados neste estudo. Trindade *et al.* (2005), com base nos perfis de rep-PCR (REP, ERIC e BOX-PCR), identificaram a presença de várias bandas comuns nas estirpes de *X. campestris* pv. *viticola* estudadas, que poderiam ser usadas para o desenvolvimento de iniciadores específicos para fins diagnósticos. Outra alternativa para potencializar a metodologia seria a combinação das técnicas PCR e ELISA, que poderia ser adotada para análise de amostras em larga escala.

Os resultados do presente estudo apontam para a necessidade de se desenvolver controles internos de falsos negativos para o método descrito. Sugere-se também que a detecção da bactéria em plantas de videiras sintomáticas seja realizada através de amostragens de folhas e ramos, preferencialmente, e de plantas jovens. No caso de amostras assintomáticas, sugere-se que sejam realizadas amostragens de ramos jovens. Em

ambos os casos é importante que o tempo entre a coleta, o processamento e a análise da amostra, com o método disponível, seja o mais rápido possível.

## **CAPÍTULO 4**

---

### **PATOGENICIDADE CRUZADA E RELACIONAMENTO GENÉTICO ENTRE AS PATOVARES *VITICOLA* E *MANGIFERAEINDICAE* DE *XANTHOMONAS* NO BRASIL**

#### **1. INTRODUÇÃO**

As áreas irrigadas do Submédio do Vale do São Francisco destacam-se como a principal região produtora e exportadora de uva e manga “in natura”. Os maiores produtores e exportadores de manga e uva do País, tendo alguns deles já alcançado mercados externos, encontram-se principalmente no Pólo Agroindustrial de Petrolina-PE e Juazeiro-BA. Nos últimos anos, diversos produtores de uva e manga aderiram ao Programa de Produção Integrada. A cultura de manga é predominante no Submédio do Vale São Francisco, com cerca de 20 mil hectares plantados, sendo a maior região produtora brasileira. Essa cultura é responsável por cerca de 16.000 empregos diretos nessa região (Silva *et al.*, 2001). Em 2005, a safra foi de 452.000 t (Camargo Filho *et al.*, 2004).

Nas áreas irrigadas do semi-árido brasileiro, a mancha angular causada pela bactéria *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* Patel, Moniz & Kulkarn é a principal doença bacteriana da mangueira. Os principais sintomas podem ser observados em folhas de brotações jovens mas raramente nos frutos. Os sintomas nas folhas são caracterizados pela presença de manchas angulares, de coloração castanho-escura, semelhantes aos sintomas causados por *X. campestris* pv. *viticola* (Figura 12). Os frutos apresentam lesões arredondadas, negras e deprimidas (Robbs *et al.*, 1974). A doença é observada, durante o primeiro semestre do ano, quando a umidade relativa do ar é elevada, num período curto de fevereiro a abril. Em condições atípicas pode ocorrer fora deste período (Tavares, 2004).



**Figura 12.** (A) Sintomas de mancha angular em folhas de mangueira causados por *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*. Fonte: Cunha *et al.* (2000). (B) Sintomas do cancro bacteriano em folha de videira, cv. Red Globe causados por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* no Submédio do Vale São Francisco, Pernambuco-PE.

A bacteriose da mangueira foi relatada pela primeira vez na Índia (Patel *et al.*, 1948), sendo o agente causal denominado *Pseudomonas mangiferaeindicae* (Patel, Moniz & Kulkarni). O segundo relato desta bacteriose foi feito no Brasil em 1955, no Rio de Janeiro (Robbs *et al.*, 1955). Robbs *et al.* (1974), através de estudo comparativo e mediante os caracteres morfológicos, culturais e bioquímicos reclassificaram a bactéria como *X. mangiferaeindicae* (Patel, Moniz & Kulkarni, 1948) Robbs, Ribeiro & Kimura (1974). Segundo Robbs *et al.* (1974), o equívoco cometido por Patel *et al.* (1948) na classificação da bactéria estava relacionado ao caráter apigmentado das estirpes por eles obtidas. Em 1974, a estirpe amarela foi isolada a partir de folhas de mangueira oriundas do município de Campinas, São Paulo (Robbs *et al.*, 1974). No Ceará, em 1977, foi realizado o segundo relato da mancha angular da mangueira e o primeiro no Nordeste do Brasil. No estado do Ceará, além da estirpe branca também foi isolada a estirpe amarela, sendo esta mais virulenta que a branca (Robbs *et al.*, 1977).

Estudos realizados por Palleroni *et al.* (1993) empregando a análise de homologia DNA-DNA entre estirpes de *Xanthomonas* e de diferentes patovares de *X. campestris* mostraram que *X. mangiferaeindicae* está mais próxima geneticamente de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. O resultado da análise das características fenotípicas de *X. mangiferaeindicae* realizadas por Pruvost *et al.* (1998), indicou que a maioria das estirpes apigmentadas de manga, exceto as estirpes brasileiras utilizadas no estudo, formou um único grupo independente do ano e local de coleta, sugerindo que a dispersão da bactéria a longas distâncias teria ocorrido por material propagativo. Os autores sugerem que as estirpes apigmentadas de *X. mangiferaeindicae* brasileiras, que foram agrupadas separadamente das demais estirpes estudadas, são oriundas de uma outra população bacteriana, provavelmente, oriunda da Ásia.

Algumas características semelhantes entre as patovares *mangiferaeindicae* e *viticola* de *Xanthomonas* são: (1) ambas foram primeiramente relatadas na Índia; (2) as colônias são apigmentadas, apesar de se observar estirpes amarelas e brancas em *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*; (3) semelhança quanto à natureza dos sintomas; (4) apresentam plantas hospedeiras em comum; (5) ambas possuem a capacidade de sobreviver epifiticamente na superfície de seus hospedeiros e, (6) a disseminação é favorecida por ventos e períodos chuvosos.

A proximidade entre estas duas patovares tem sido observada em diversos trabalhos. Araújo (2001) observou reações cruzadas entre o antissoro produzido contra *X. campestris* pv. *viticola* e pv. *mangiferaeindicae* em testes sorológicos. O autor sugere que as reações cruzadas tenham ocorrido devido ao fato de que estas estirpes só se diferenciam em nível subespecífico. Trindade (2002) utilizando a técnica de rep-PCR (REP, ERIC e BOX-PCR) e analisando o seqüenciamento da região correspondente ao gene *hrpB6* constatou a alta similaridade entre quatro estirpes de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* e de 41 estirpes de *X. campestris* pv. *viticola*. Embora *X. campestris* pv. *viticola* seja capaz de infectar manga em condições de inoculação artificial (Araújo, 2001), não é conhecido se estirpes da patovar *mangiferaeindicae* são capazes de infectar *V. vinifera* L.

No desenvolvimento de oligonucleotídeos específicos para *X. campestris* pv. *viticola* (Capítulos 2 e 3), observou-se que os pares de iniciadores Xcv1F/3R e RST2/Xcv3R que possuem como alvo uma região ligada à patogenicidade, foram capazes de detectar *X. campestris* pv. *viticola*, bem como *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* confirmando a proximidade entre as duas patovares. Embora os iniciadores não tenham permitido diferenciar as estirpes das duas patovares, estas puderam ser separadas pela digestão dos produtos da PCR com a enzima *HaeIII* após amplificação com os iniciadores

RST2/Xcv3R. Após a digestão, um único padrão foi observado para as estirpes de *X. campestris* pv. *viticola* brasileiras e para o isolado tipo oriundo da Índia. Os padrões foram, contudo, diferentes dos padrões de restrição obtidos para as quatro estirpes de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (Capítulo 2).

Vauterin *et al.* (1995) com base em estudos de homologia DNA-DNA propuseram uma nova classificação das espécies do gênero *Xanthomonas*, que seria composto por 20 espécies. Contudo, *X. campestris* pv. *viticola* e pv. *mangiferaeindicae* não foram incluídas neste estudo. O seqüenciamento de DNA permite maior confiabilidade quanto à identidade molecular e, por isso é muito utilizado no estudo das relações genéticas entre organismos proximamente relacionados e nos diversos níveis taxonômicos (Marques *et al.*, 2002).

Diante da necessidade de estudos para o melhor entendimento da classificação taxonômica destas duas patovares, *viticola* e *mangiferaeindicae*, a comparação entre regiões genômicas pode contribuir para o estudo da relação entre estas patovares.

A análise das seqüências do gene da subunidade menor 16S rRNA, é tido como um método eficiente para a determinação das relações ao nível de gênero (Martinati, 2003). Moore *et al.* (1997) estudando o gene da subunidade 16S rRNA de oito espécies do gênero *Xanthomonas* (*X. campestris*, *X. campestris* pv. *graminis*, *X. albilineans*, *X. axonopodis*, *X. fragariae*, *X. maltophilia*, *X. oryzae* e *X. populli*, além de seqüências de estirpes dos gêneros *Stenotrophomonas*, *Xylella*, *Comamonas*, *Thiobacillus*, *Chromatium*, *Escherichia*, *Haemophilus*, *Acinetobacter* e *Pseudomonas*, sugeriram que o gênero *Xanthomonas* é monofilético, estando mais próximo do gênero *Stenotrophomonas*. A partir das análises dos resultados, os autores sugeriram que o estudo das seqüências do gene 16S rRNA é extremamente informativo nos estudos filogenéticos entre gêneros.

Em procariotos, o rDNA contém todos os três genes, 16S, 23S e 5S rRNA. Estes genes são separados por regiões espaçadoras que exibem um alto grau de variação no comprimento e seqüência nucleotídica ao nível de gênero e espécie (Jensen *et al.*, 1993). Em contraste às seqüências do gene 16S rRNA, a heterogeneidade presente na região espaçadora 16S-23S tem sido amplamente explorada para a identificação e estudo filogenético de bactérias fitopatogênicas (Jensen *et al.*, 1993; Barak & Gilbertson, 2003; Martinati, 2003). Gonçalves & Rosato (2000) analisaram as seqüências espaçadoras dos genes ribossomais 16S-23S de 55 estirpes de *Xanthomonas* isoladas de plantas de maracujá e o relacionamento dessas estirpes com diferentes espécies de *Xanthomonas*. A análise combinada dos marcadores moleculares RAPD, rep-PCR e RFLP da região intergênica associada à hibridização DNA:DNA permitiu alocar as estirpes da patovar *passiflorae* como *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. Gonçalves & Rosato (2002) estudaram a relação filogenética de 17 espécies de *Xanthomonas* baseada na análise da região espaçadora 16S-23S e no gene 16S. Os autores observaram que as árvores filogenéticas foram bastante semelhantes, porém o maior número de agrupamentos formados foi encontrado no estudo da região ITS, quando comparado à região do gene 16S rRNA.

As bactérias fitopatogênicas possuem um sistema de secreção tipo III (TTSS-“Type III Secretion System”), que é codificado por um conjunto de genes denominados *hrp* (“hypersensitive response and pathogenicity”). Esses genes são responsáveis pela doença em plantas hospedeiras suscetíveis e pela resposta de hipersensibilidade em plantas resistentes ou não hospedeiras (Van Gijsegem & Cornelis, 2000; Carvalho, 2006). Os genes *hrp* estão organizados em um “cluster” codificando 15-20 proteínas Hrp (Cornelis & Van Gijsegem, 2000). Segundo Noël *et al.* (2002) nove proteínas Hrp são altamente conservadas em patógenos de plantas e animais. Em *Xanthomonas campestris* pv.

*vesicatoria* o “cluster” gênico *hrp* é essencial para a interação patógeno hospedeiro (Buttner *et al.*, 2002). Segundo Collmer *et al.* (2004) o gene *hrp* em *Pseudomonas syringae* é responsável pela injeção de proteínas de virulência dentro da célula da hospedeira.

Em eucariotos os genes dos citocromo *b561* são conhecidos por estarem envolvidos na detoxificação de espécies nativas de oxigênio. Estes genes não são relatados em fungos ou procariotos (Verelset & Asard, 2003), porém estudos recentes mostraram a presença em bactérias de regiões com similaridade a esses genes denominados “cytochrome *b561*-like” (Duan & Gabriel, 2004). Esses genes são muito semelhantes aos genes *b561* eucarióticos que são altamente conservados e seus produtos possuem resíduos de histidina. Baseado em dados genômicos publicados, a maioria das bactérias contém 2 ou 3 genes parálogos *b561*. Duan & Gabriel (2004) clonaram e sequenciaram os genes semelhantes ao gene *b561*-like de mais de 30 estirpes de *Xanthomonas* e concluíram que esses genes podem ser utilizados na tipagem de estirpes em nível de patovar e/ou espécie.

Os plasmídeos são moléculas de DNA circular, presentes em múltiplas cópias nas células bacterianas e têm origem de replicação autônoma. Na natureza, as bactérias apresentam esse tipo de DNA extracromossomal e, em geral, os plasmídeos codificam genes que conferem vantagens adaptativas àquelas células como, por exemplo, a resistência a antibióticos e produção de cápsula ou fimbrias de adesão (Azevedo, 1998). Diversos plasmídeos já foram bem estudados na literatura como o plasmídeo F de *E. coli* K-12 ou os plasmídeos colicinogênicos presente em *Aerobacter*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella* e *Shigella* (Azevedo, 1998).

*Xanthomonas campestris* divide-se em diversas patovares de acordo com a espécie hospedeira. Segundo Stripecke & Rosato (1988) a especificidade de algumas patovares às suas hospedeiras é baixa, podendo infectar outras espécies de plantas. O estudo do perfil

plasmidial de plasmídeos nativos das patovares de *Xanthomonas campestris* tem se tornado importante no estudo desta patovar. O crescente interesse no estudo dos plasmídeos está relacionado à sua importância na patogenicidade, na especificidade à planta hospedeira e à presença de genes de resistência (Vivian *et al.*, 2001).

Devido à alta similaridade observada entre as duas patovares *viticola* e *mangiferaeindicae* de *Xanthomonas*, em testes de detecção, moleculares e sorológicos, a alta similaridade encontrada na análise da seqüência do gene *hrpB6*, a alta similaridade nos aspectos fenotípicos, bioquímicos e epidemiológicos, sugere-se que estas bactérias estão altamente relacionadas, podendo até mesmo pertencer à mesma espécie, subespécie ou patovar.

Diante da necessidade de estudos para o melhor entendimento da classificação taxonômica destas duas patovares, são objetivos deste trabalho: (1) realizar inoculações cruzadas em mudas de videira e mangueira através de diferentes métodos de inoculação para o melhor entendimento da relação biológica entre as duas patovares; (2) analisar as seqüências correspondentes aos genes 16S rRNA, ITS, Citocromo *b561-like* e o gene *hrpB6* comparando-as às seqüências das estirpes bacterianas de *X. campestris* e *X. axonopodis* e outras espécies disponíveis e depositadas no GenBank e, (3) comparar os perfis plasmidiais das estirpes bacterianas de *X. campestris* pv. *viticola* e pv. *mangiferaeindicae*.

## 2- MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1- Avaliação da patogenicidade cruzada em mudas de videira e mangueira

#### 2.1.1- Estirpes bacterianas e preparo do inóculo

No experimento utilizando método de infiltração e picada foram utilizadas três estirpes de *X. campestris* pv. *viticola* coletadas no Submédio do Vale São Francisco em Petrolina, PE: UnB 1183, UnB 1216 e UnB 1223 e o isolado tipo NCPPB 2475. Três estirpes de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* foram utilizadas, sendo elas: UnB 764 (estirpe branca) e 769 (amarela) e IBSBF 1230 (branca) (Tabela 11).

As estirpes foram cultivadas por 48 horas em meio 523 de Kado e mantidas a 28 °C. A concentração da suspensão bacteriana foi comparada a escala 7 de Macfarland e a concentração ajustada para  $10^8$  UFC/ml. As plantas foram mantidas em câmara úmida úmida por 48 horas antes e 48 horas após a infiltração.

Para a inoculação pelo método de pulverização, as suspensões bacterianas, preparadas em tampão fosfato, foram borrifadas, em todas as folhas de cada planta, e mantidas em câmara úmida 48 horas antes e 48 horas após a inoculação. A concentração bacteriana foi determinada pela medida da absorbância a 550 nm ( $Abs = 0,575$  refere-se à concentração de  $2,54 \times 10^8$  UFC/ml) (Mariano & Silveira, 2005), em espectrofotômetro digital UV-1203 (Shimazu Corporation) e ajustadas para a concentração de  $2,54 \times 10^8$  UFC/ml.

**Tabela 11.** Estirpes bacterianas de *Xanthomonas campestris* utilizadas neste estudo.

Patovar	Estirpe <sup>e</sup>	Origem	Local de origem	Ano da coleta
<i>viticola</i>	<sup>a</sup> NCCPB 2475	<i>Vitis vinifera</i> -Anabi-e- Shahi	Índia	1972
	<sup>b</sup> UnB 1183	<i>V. vinifera</i> - cv. Red Globe	Petrolina, PE	1998
	<sup>c</sup> IBSBF 1386	<i>V. vinifera</i> -cv. Ribier	Teresina-PI	1998
	IBSBF 1369	<i>V. vinifera</i> -cv. Red Globe	Petrolina-PE	1998
	UnB 1205	<i>V. vinifera</i> - cv. Itália	Sobradinho- BA	2000
<i>mangiferaeindicae</i>	UnB 769	<i>Mangifera indica</i>	Planaltina - DF	1990
	UnB 764	<i>M. indica</i>	Planaltina - DF	1990
	IBSBF 1230	<i>M. indica</i>	Brasil	1996
	IBSBF 1508	<i>Anacardium occidentale</i>	Brasil	1999
	<sup>d</sup> CCP-76	<i>A. occidentale</i>	Pacajus-CE	2004

<sup>a</sup>NCCPB - National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, <sup>b</sup>UnB- Universidade de Brasília/Coleção de Bactérias Fitopatogênicas do Depto. de Fitopatologia-UnB, <sup>c</sup>IBSBF – Instituto Biológico Setor de Bacteriologia Fitopatológica-SP, <sup>d</sup>Embrapa Agroindústria Tropical- Fortaleza-CE.

### **2.1.2- Métodos de inoculação e desenho experimental**

No primeiro experimento foram testados dois métodos de inoculação: (1) método da infiltração no limbo foliar com seringa sem agulha; (2) método de ferimento com agulha na superfície foliar seguida de deposição de uma gota da suspensão bacteriana. O segundo experimento consistiu na inoculação de suspensão bacteriana obtida a partir da estirpe UnB 1183 de *X. campestris* pv. *viticola* e da estirpe UnB 769 de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* pelo método de aspersão, teoricamente mais próximo ao que ocorre no campo.

Foram utilizadas oito plantas de videira da cv. Festival, com 3 meses de idade e oito mudas de mangueira da cv. Tommy Atkins com 1 ano de idade para as inoculações (1) e (2). Para a inoculação por pulverização (3) foram utilizadas duas plantas de *V. vinifera* cv. Festival com 3 anos de idade e duas plantas de manga cv. Tommy Atkins.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia, Universidade de Brasília, sob condições controladas (incubadora modelo Percivall PT 80) com temperatura de 28 °C e fotoperíodo de 12 horas. O experimento foi mantido por um período de 30 dias e repetidos por pelo menos duas vezes. Uma planta de cada hospedeira foi mantida como testemunha, sendo inoculada com água estéril.

### **2.1.3. Avaliação dos sintomas e reisolamentos**

Para o primeiro experimento com os métodos de inoculação 1 e 2, os sintomas foram avaliados a cada sete dias totalizando quatro leituras. As leituras foram feitas através da medição do tamanho das lesões utilizando uma régua milimetrada. A severidade dos

sintomas foi avaliada após 30 dias de acordo com a escala de notas desenvolvida por Malavolta *et al.* (2003) com modificações, onde: (0) sem sintomas; (1) lesões esparsas, puntiformes; (2) lesões esparsas, angulares ou coalescidas com dimensões de até 0,3 cm; (3) lesões coalescidas em toda a infiltração até 0,4 cm e, (4) lesões coalescidas que ultrapassam a área de infiltração/destruição do limbo, maiores que 0,4 cm. Na inoculação empregando o método de pulverização de suspensão bacteriana, a avaliação foi feita através da observação do aparecimento dos sintomas ao longo de 40 dias.

O reisolamento foi feito a partir de tecidos de videira e de mangueira com sintomas foliares causados por *X. campestris* pv. *viticola* e pv. *mangiferaeindicae*. Partes do tecido vegetal foram desinfestadas superficialmente, em álcool 70 % e hipoclorito de sódio 0,7 %, superficialmente e macerados em água destilada estéril. O macerado obtido foi distribuído em placas de Petri contendo meio 523 de Kado. As placas foram incubadas a 29 °C por 48 horas.

A identificação das colônias reisoladas foi realizada através de testes bioquímicos (método de Ryu para a reação de Gram e utilização de asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio) e testes moleculares com os iniciadores RST2/Xcv3R e Xcv1F/Xcv3R (Capítulo 2).

## **2.2- Estudo filogenético das estirpes de *X. campestris* pv. *viticola* e *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae***

### **2.2.1- Estirpes bacterianas utilizadas neste estudo**

As cinco estirpes de *X. campestris* pv. *viticola* foram selecionadas de acordo com as origens geográficas e de diferenças observadas entre os perfis moleculares obtidos em estudos de rep-PCR (Trindade *et al.*, 2005). Foram utilizadas todas as cinco estirpes de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* disponíveis na coleção de bactérias fitopatogênicas do

Laboratório de Fiotpatologia, UnB, Brasília, DF. A descrição das estirpes utilizadas neste estudo está na Tabela 10.

### **2.2.2 - Cultivo e preservação das estirpes**

Para as repicagens de rotina e preparo de inóculo para realização dos testes bioquímicos e moleculares foi utilizado o meio 523 modificado (Kado & Heskett, 1970). Os isolados foram preservados em água destilada estéril a temperatura ambiente, e em glicerol a 30 %, mantidos a  $-80^{\circ}\text{C}$  (Sambrook & Russel, 2001).

### **2.2.3- Extração e quantificação de DNA genômico**

Para extração do DNA total do genoma bacteriano utilizou-se o protocolo modificado de Ausubel *et al.* (1992) conforme descrito no item 2.2 do Capítulo 2. A quantificação foi feita por meio da análise comparativa da intensidade das bandas das amostras com 200 ng do marcador  $\lambda$  *HindIII* (GIBCO, BRL) em gel de agarose a 0,8 %. As condições de corrida se deram a 80 V durante 1 hora. O gel foi corado em brometo de etídio (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) e descorado em água destilada, para posterior fotodocumentação (Eagle EYE<sup>TM</sup> - II Stratagene<sup>®</sup>). Após a quantificação foram preparadas alíquotas de trabalho com uma concentração final de 50 ng/ $\mu\text{l}$  de DNA.

#### **2.2.4- Análise de seqüências da região semelhante ao gene do citocromo *b561* e desenho de iniciadores para esta região**

Seqüências referentes à região do citocromo *b561* de *X. campestris* pv. *campestris* estirpe ATCC33913 (depositadas no GenBank sob número de acesso AE012268) e *X. axonopodis* pv. *citri* estirpe 306 (número de acesso AE011801) foram alinhadas através do programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). A partir do alinhamento, usando como seqüência de referência a de *X. campestris* pv. *campestrisi*, foram identificadas as regiões de maior homologia para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores utilizando o programa Primer 3 (Rozen & Skaletsky, 1998). Os números de acessos das seqüências utilizadas neste estudo estão disponibilizados no Anexo 4. Os iniciadores foram designados de Cit B561 L (“forward”) iniciando na posição 131 com 19 nucleotídeos e 52,63% de GC, e Cit B561 R (“reverse”) iniciando na posição 482 com 17 nucleotídeos e 64,71% de GC. Para este par de iniciadores o tamanho do produto amplificado esperado é de 352pb (Tabela 11).

#### **2.2.5. - Amplificação da região ITS do DNA ribossomal (rDNA), 16S rRNA, *hrpB6* e citocromo *b561*.**

Os iniciadores utilizados para a amplificação da região intergênica 16-23S, (ITS) do DNA ribossomal (rDNA), 16S rRNA, *hrpB6* e citocromo *b561* estão descritos na Tabela 12.

**Tabela 12.** Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação da região ITS do DNA ribossomal (rDNA), 16S rRNA, do gene citocromo *b561-like* e *hrpB6* do DNA das estirpes bacterianas utilizadas neste estudo.

Região	Seqüência (5' → 3')	Tamanho esperado (pb)	Referência
ITS	L1- CAA GGC ATC CAC CGT G1-GAA GTC GTA ACA AGG	600	Jensen <i>et al.</i> , 1993
16S	16S rRNA/8/27 – GAG TTT GAT CNT GGC TCA G 16S rRNA/461/477- AAG GAT CGG GTA TTA AC	480	Maes <i>et al.</i> , 1996
<i>hrpB6</i>	RST2 – AGG CCC TGG AAG GTG CCC TGG RST3- ATC GCA CTG CGT ACC GCG CGC GA	840	Leite Jr. <i>et al.</i> , 1994
Citocromo “ <i>b561-like</i> ”	Cit B561 L- ACT TTG GCT TGC TGG TGC T Cit B561 R- TCG CGC AAC ACC AGG TG	352	Este trabalho

## **2.2.6- Condições para amplificação por PCR**

### **2.2.6.1- Região espaçadora (ITS) do rDNA e 16S rRNA**

A região espaçadora do rDNA foi amplificado via PCR em uma reação contendo: 25 pmol de cada iniciador 0,2 mM de cada um dos dNTP's; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; tampão da enzima 1X (20 mM Tris HCl, pH 8,4; 50 mM de KCl); 1,25U de *Taq* DNA polimerase (Gibco-BRL); 50 ng de DNA e água miliQ para um volume de 25 µl. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador PT-100 (MJ Research, Watertown, Mass). A temperatura de desnaturação inicial foi de 95 °C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos de: 95 °C por 1 minuto, 50 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos, com extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Para a amplificação da região correspondente ao gene 16S rRNA foram usadas as mesmas concentrações dos reagentes e as mesmas condições de amplificação citadas para a região 16-23S do rDNA.

### **2.2.6.2- Gene *hrpB6***

Para a amplificação da região correspondente ao gene *hrp*, foram usadas as mesmas concentrações dos reagentes descritas acima e o seguinte programa de amplificação: desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 62 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos, com extensão final por 5 minutos a 72 °C.

### **2.2.6.3- Região semelhante ao gene do citocromo *b561***

Para a amplificação da região correspondente ao gene do citocromo *b561-like* foram utilizados os seguintes componentes: 25 pmol de cada iniciador; 0,2 mM de cada um dos dNTP's; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; tampão da enzima 1X (20mM Tris HCl, pH 8,4; 50mM de KCl); 1,25U de *Taq* DNA polimerase (Gibco-BRL); 50 ng de DNA e água milliQ para um volume de 25 µl. A reação de amplificação foi realizada a uma temperatura de desnaturação inicial de a 95 °C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 52 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos, com extensão final de 10 minutos a 72 °C. Controles negativos (reações livres de DNA molde) foram incluídos em todos os experimentos para verificar a presença de contaminantes.

### **2.2.7 – Análise e purificação dos produtos de PCR e seqüenciamento**

Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5 X, a 90 V e 110 mA, por cerca de 1,5 a 2 horas. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml) durante 15 a 20 minutos, descorado em água destilada por aproximadamente 40 minutos e, em seguida, fotodocumentado com Eagle Eye II (Stratagene).

Os produtos de PCR das quatro regiões foram purificados através do método de precipitação da seguinte forma: adicionou-se ao volume final da PCR a metade do volume de acetato de amônio e em seguida acrescentou-se 2,5 vezes o volume da reação de etanol 100 %. Precipitou-se o DNA a -80 °C por 16 horas. Em seguida, foi realizada a centrifugação a velocidade máxima, 12000 x g (40000rpm), a 4 °C por 40 minutos, o

sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com 100 µl de etanol 70 %, sem dissolver o precipitado. Foi realizada uma nova centrifugação a temperatura ambiente por 5 minutos a 5.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco em estufa a 37 °C por 2 horas. Após a secagem este foi ressuscitado em 15 µl de água milliQ estéril.

Os produtos purificados foram enviados para o seqüenciamento automático no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília e para o Laboratório de Genômica da Embrapa Recursos Genéticos em Brasília-DF

O seqüenciamento foi realizado num sequenciador por capilaridade Mega Base 1.000 – DNA Analyzer System (Pharmacia Biotech, EUA), com condições de corrida envolvendo voltagem de injeção de 3 KV, tempo de injeção de 60 segundos e voltagem de corrida de 9 V.

#### **2.2.8- Análise do seqüenciamento e construção das árvores filogenéticas**

A qualidade das seqüências obtidas foi determinada pelo valor de PHRED (Erwin *et al.*, 1998). As seqüências nucleotídicas foram analisadas através de conexão eletrônica ao NCBI (National Center for Biotechnology Information –USA) pela comparação com seqüências já depositadas no GenBank através do programa BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”) (Fassler *et al.*, 2000).

A análise filogenética das seqüências das estirpes bacterianas utilizadas neste estudo foi realizada utilizando o pacote de programas PHYLIP (Phylogeny Inference Package) (Felsenstein, 2006) versão 3.6. As fitas consensos das seqüências nucleotídicas foram geradas pelo programa BioEdit, assim como o alinhamento entre as seqüências foi confirmado pelo programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). A distância evolutiva foi

calculada utilizando o programa DNAdist, pelo método de dois parâmetros de Kimura (1990). As relações filogenéticas foram determinadas pelo método Neighbor-Joining. A reprodutibilidade de cada ramo da árvore foi estimada pelo método Bootstrap com 1000 repetições (Hillis & Bull, 1993). O programa Consensus Tree foi utilizado para a geração da árvore consenso. As árvores filogenéticas foram geradas pelo programa TreeView (Page, 1996).

## **2.3- Estudo do perfil plasmidial**

### **2.3.1- Extração de DNA plasmidial**

Para extração do DNA plasmidial bacteriano das estirpes foram testados três diferentes protocolos, a saber:

(1) As células das estirpes bacterianas foram crescidas em meio 523 líquido a 29°C por 48 horas. Um mililitro de suspensão de células bacterianas foi centrifugado embebido em solução de agarose (clean cut 2%) conforme protocolo descrito por CHEF-DR II's Instruction Manual and Applications Guide (catálogo nº 170-3612, BioRad, USA). Os blocos contendo as células bacterianas foram lisados utilizando Proteinase K (1mg/ml) não sendo necessária a adição de lisozima.

(2) Um mililitro de células bacterianas crescidas em meio 523 líquido a 29 °C/48 horas foi coletado e as células ressuspendidas em 100 µl de tampão (15 % [peso/vol] de sacarose, 40 mM de tris-hidróxido, 2 mM de EDTA, pH 7,9). As células foram lisadas pela adição de 200 µl de lisina (3% [peso/vol] dodecil sulfato de sódio, 50 mM de de Tris, pH 12,5). A solução foi aquecida a 60 °C por 30 minutos e adicionou-se 5 U de Proteinase K. Os tubos foram invertidos por 20 vezes e incubados a 37 °C por 90 minutos.

Posteriormente, o DNA plasmidial foi purificado com 1 ml de clorofórmio:álcool-isoamílico de acordo com Jensen *et al.* (1995).

(3) O terceiro protocolo utilizado foi de Sambrook & Russel (2001) com modificações. As bactérias foram crescidas em 50 ml de meio Luria Bertani (extrato de levedura 0,5 %; peptona de caseína 1 %; NaCl 1 %; pH 7,2) por 16 horas sob agitação a temperatura ambiente. As células foram coletadas por centrifugação a 5.000 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 2 ml da solução I (25 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM de EDTA; pH 8,0; 50 mM de Glicose). A suspensão foi transferida para um tubo de vidro e adicionou-se 10 % de Triton X-100 e incubou-se por 30 minutos a temperatura ambiente. Foi adicionado 0,4 ml de 3 M, de acetato de sódio, pH 5,2, sendo levemente agitado. No último passo foram adicionados 10 ml de etanol gelado. Com o auxílio de um bastão de vidro com a ponta em forma de gancho, em movimentos circulares em um único sentido, o DNA plasmidial foi enrolado no bastão e seco ao ar livre à temperatura ambiente por 2 horas. Finalmente, o DNA plasmidial foi ressuspendido em 1ml de TE e armazenado à -20 °C até a sua utilização.

### **2.3.3 – Análise dos perfis plasmidiais**

A análise dos perfis plasmidiais foi feita por meio da análise comparativa por eletroforese em gel. Para o método 1 os blocos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (0,6 %) em campo pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis) a 2 V/cm, 123 mA por 18 horas. Para os métodos 2 e 3, a análise foi feita em gel de agarose a 0,6 % em TAE 1X. As condições de corrida foram 50 V durante 3 horas. O gel foi corado em brometo de

etídio (0,5 µg/ml) e descorado em água destilada, para posterior fotodocumentação (Eagle EYE™ - II Stratagene®).

### **3- RESULTADOS**

#### **3.1.-Avaliação da patogenicidade cruzada em mudas de videira e manga**

Após três dias da inoculação, as videiras cv. Festival inoculadas pelos métodos de infiltração no limbo foliar e pelo método da picada, com as estirpes UnB 769 e IBSBF 1230 de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*, apresentaram sintomas caracterizados por pequenos pontos necróticos no local de inoculação. O mesmo pode ser observado para as plantas de videiras inoculadas com as estirpes de *X. campestris* pv. *viticola*. Sete dias após a inoculação todas as videiras apresentavam sintomas caracterizados pela formação de lesões necróticas a partir do ponto de inoculação. Foi observado que no caso da infiltração no limbo foliar ou pelo método de picada os sintomas se desenvolveram mais rapidamente chegando a alguns casos na completa destruição do limbo foliar. Após trinta dias da inoculação observou-se que a evolução dos sintomas nas plantas de videira foi bastante semelhante para as estirpes das duas patovares utilizadas neste estudo.

As plantas de manga, cv. Tommy Atkins, inoculadas tanto com as estirpes de *X. campestris* pv. *viticola* quanto com as estirpes de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* não apresentavam sintomas após três dias de inoculação. Os primeiros sintomas observados em manga ocorreram sete dias após a inoculação, para todas as estirpes utilizadas neste estudo, caracterizados pelo aparecimento de lesões necróticas no local de inoculação tanto as plantas inoculadas pelo método da infiltração no limbo foliar ou pelo método da picada. Foi observado que os sintomas não se desenvolveram tão rapidamente em manga quanto

foi observado em plantas de videira. Trinta dias após a inoculação as plantas de manga inoculadas tanto com as patovares *viticola* e *mangiferaeindicae* apresentavam lesões coalescidas que ultrapassavam o ponto de infiltração. Durante todo o experimento nenhuma planta testemunha apresentou sintomas. Os resultados encontram-se sumarizados na Tabela 13.

**Tabela 13.** Inoculação cruzada pelo método de infiltração no limbo foliar em folhas de videira da cv. Festival e mangueira cv. Tommy Atkins das estirpes de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*

Patovares/estirpes	Videira			Mangueira		
	<sup>a</sup> Sev	<sup>b</sup> Reisol.	<sup>c</sup> BIO-PCR	<sup>a</sup> Sev	<sup>b</sup> Reisol.	<sup>c</sup> BIO-PCR
<i>pv. viticola</i>						
NCCPB 2475	1	+	+	2	-	-
UnB 1183	2	-	-	4	+	+
UnB 1216	2	+	+	2	+	+
UnB 1223	2	-	-	3	+	+
<i>pv. mangiferaeindicae</i>						
IBSBF 1230	2	+	-	4	+	+
UnB 769	4	+	+	4	+	+
UnB 764	1	+	+	4	+	+

<sup>a</sup>Sev - Avaliação da Severidade pela escala de notas: (0) sem sintomas; (1) lesões esparsas, puntiformes; (2) lesões esparsas, angulares ou coalescidas com dimensões de até 0,3 cm; (3) lesões coalescidas em toda a infiltração até 0,4 cm e, (4) lesões coalescidas que ultrapassam a área de infiltração/destruição do limbo, maiores que 0,4 cm.; <sup>b</sup>Reisol. - reisolamento do patógeno avaliação visual (+) da presença da colônia suspeita ou (-) ausência de colônias suspeitas. <sup>c</sup>BIO-PCR – Amplificação com os oligonucleotídeos Xcv1F/ Xcv3R.

Com o método da pulverização das estirpes UnB 1183 (*X. campestris* pv. *viticola*) e UnB 769 (*X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*), os primeiros sintomas foram observados 15 dias após a inoculação, sendo caracterizados pela presença de manchas puntiformes necróticas ao longo da margem de todo o limbo foliar de (Figura 13). Após 30 dias, as plantas de videira apresentavam total destruição do limbo foliar caracterizado pelo secamento das folhas, permanecendo presas às plantas. Não foram observados sintomas nas plantas de mangueiras inoculadas com a estirpe UnB 1183 ou UnB 769. Foi observado o secamento dos ramos terminais nas mudas de manga, porém, não foi possível isolar a bactéria desse tecido. Na segunda repetição deste experimento, obteve-se o mesmo resultado (Tabela 14).

A identificação das colônias reisoladas foi confirmada através de testes moleculares por nested-BIO-PCR (Tabela 14) e bioquímicos (método de Ryu e crescimento em asparagina).

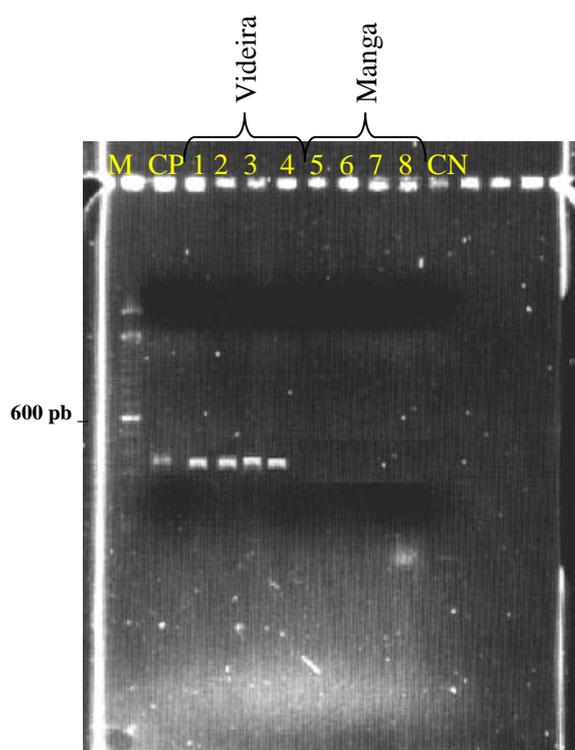


**Figura 13** – Sintomas iniciais observados nos bordos do limbo foliar em plantas de videira cv. Festival, inoculadas através de pulverização com as estirpes (A) UnB 1183 de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e (B) UnB 769 de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*.

**Tabela 14.** Avaliação da patogenicidade cruzada pelo método de pulverização, em videira da cv. Festival e mangueira cv. Tommy Atkins, com as estirpes UnB 1183 de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e UnB 769 de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*

Patovar	Videira	Mangueira
pv. <i>viticola</i> (UnB 1183)	+	-
pv. <i>mangiferaeindicae</i> (UnB 769)	+	-

(+) presença de sintomas foliares (-) ausência de sintomas foliares

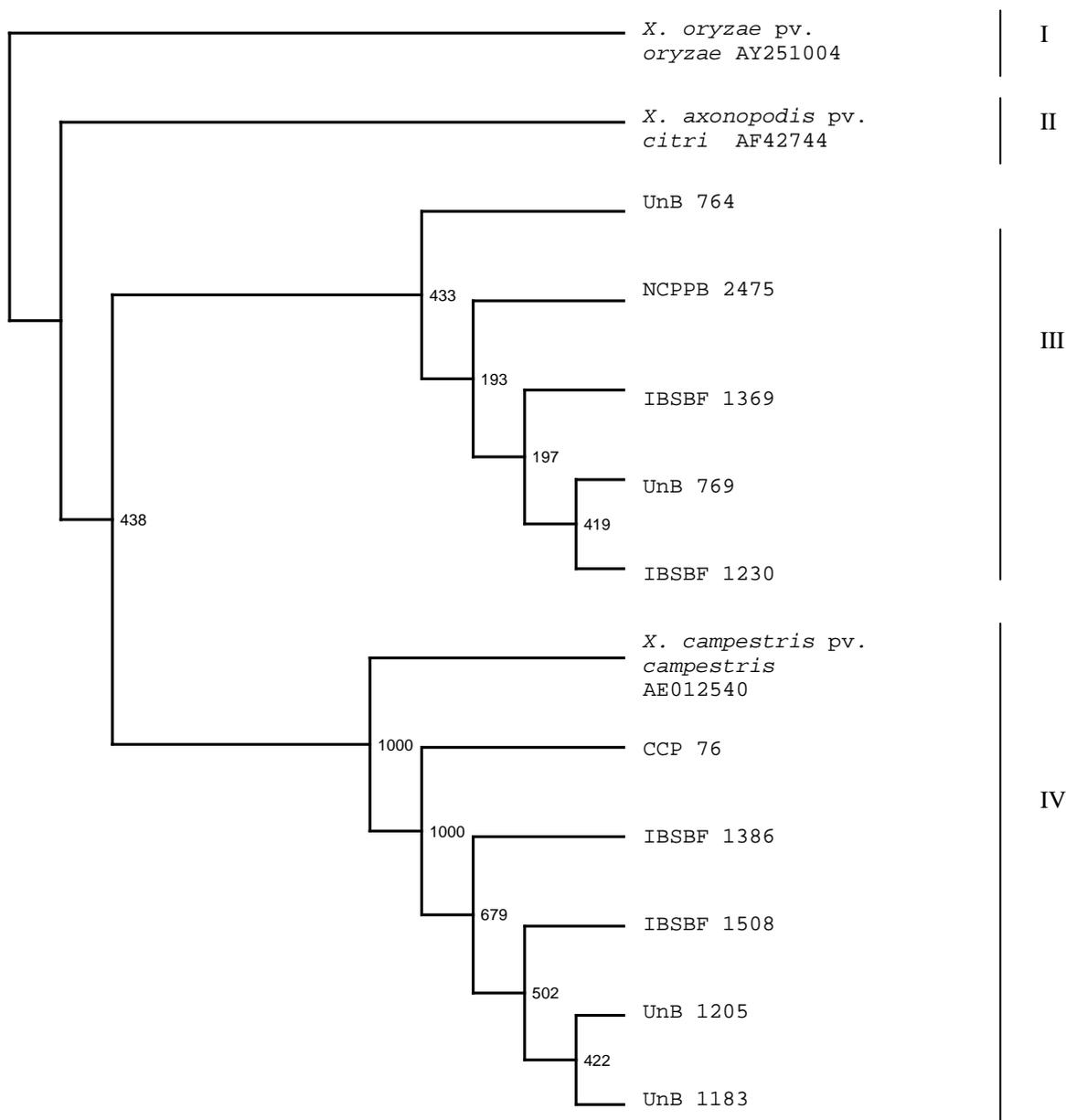


**Figura 14.** Amplificação por PCR com o par de iniciadores RST2/Xcv3R, visualizada em gel de agarose a 1 %. M- 100pb-ladder (GIBCO/BRL); linha CP- controle positivo: suspensão de células de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, linhas 1 e 2- planta de videira inoculadas com as estirpes UnB 1183; linhas 3 e 4 planta de videira inoculada com a estirpe UnB 769; linhas 5 e 6- planta de manga inoculada com a estirpe UnB 1183; linhas 7 e 8 – planta de manga inoculada com a estirpe UnB 769 e CN – controle negativo.

### 3.2. Análises filogenéticas

O comprimento das seqüências das regiões ITS, 16S rRNA, *hrpB6* e citocromo *b561*, analisadas foram: 560, 680, 420 e 260pb, respectivamente.

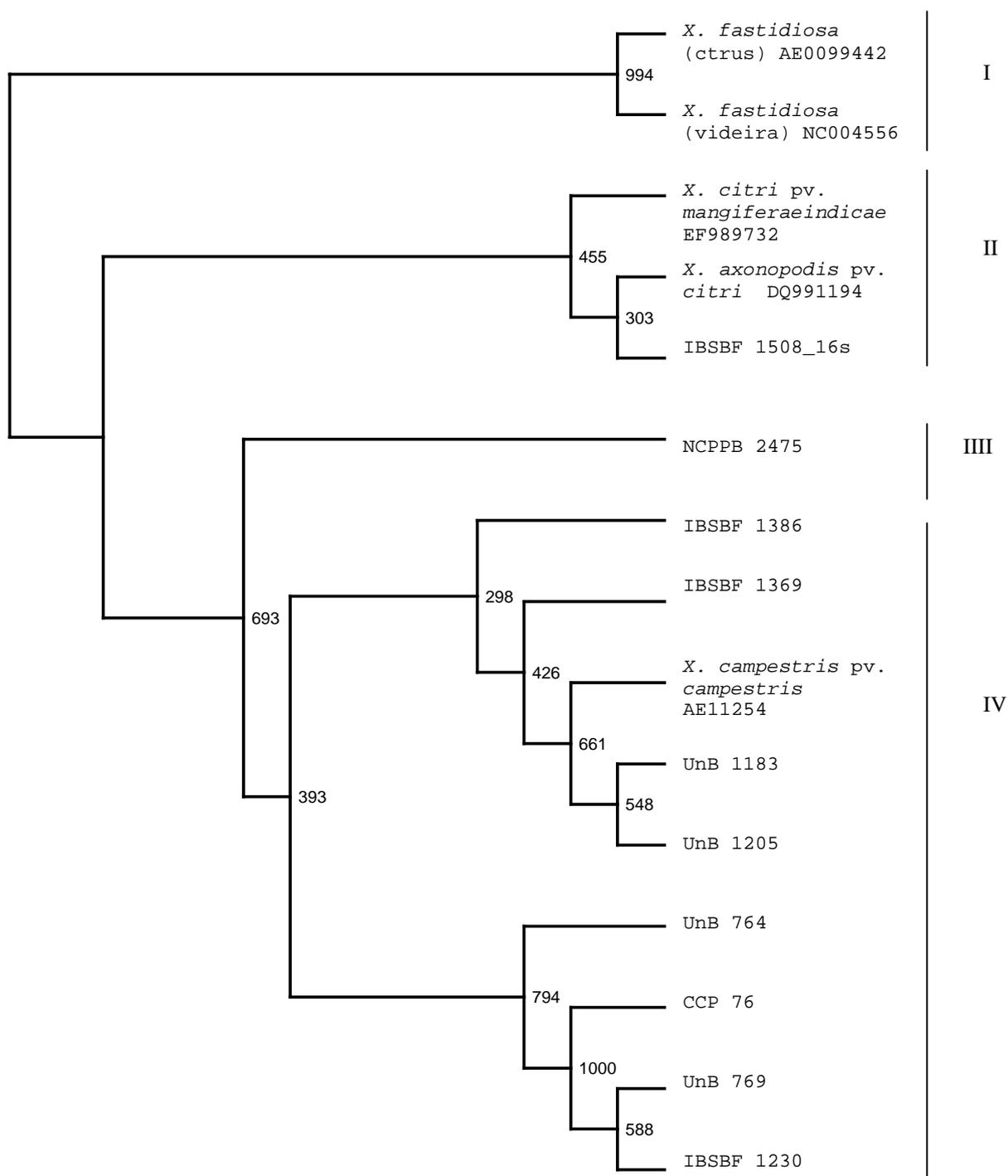
A análise das seqüências ITS do rRNA, utilizando o programa BLAST, mostrou que os produtos de amplificação destas regiões das estirpes de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* apresentaram homologia com a região espaçadora do 16-23S rRNA das bactérias *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* estirpe CNPH411(número de acesso AY288081.1) e *X. axonopodis* pv. *citri* estirpe LW (número de acesso AF442744.1), variando de 91 a 99 % entre as estirpes (lista de identidade em anexo). A árvore filogenética das estirpes das patovares *viticola* e *mangiferaeindicae*, tendo como grupo externo *X. oryzae* pv. *oryzae* (número de acesso AY251004), mostrou a existência de quatro grupos filogenéticos (Figura 15). O primeiro e o segundo grupo eram formados pelas espécies *X. oryzae* pv. *oryzae* (outgroup) e *X. axonopodis* pv. *citri* (AF442744), respectivamente. No terceiro ramo foram agrupadas 3 estirpes de *X. campestris* pv. *mangifereindicae*, isoladas de mangueira e duas estirpes de *X. campestris* pv. *viticola* (NCPFB 2475 e IBSBF 1369). O quarto grupo formado por três estirpes de *X. campestris* pv. *viticola* e as duas estirpes de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* isoladas de cajueiro. Nesse grupo também foi alocada *X. campestris* pv. *campestris* (AE012540). Pode-se observar que os valores de “bootstrap” no terceiro agrupamento foram menores que 50 %.



**Figura 15.** Árvore filogenética gerada a partir de seqüências da região ITS de cinco estirpes de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (NCPBP 2475, UnB 1183, UnB 1205, IBSBF 1386, IBSBF 1369) e cinco de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (UnB 764, UnB 769, IBSBF 1230, IBSBF 1508, CCP 76) e seqüências depositadas no GenBank de *X. campestris* pv. *campestris* (AE012540); *X. axonopodis* pv. *citri* (AF442744) A árvore consenso foi gerada através do programa Phylip e TreeView e valores de Bootstrap (1000 repetições) estão localizados nos nodos da árvore. A determinação dos grupos filogenéticos está descrito à direita da árvore.

A análise das seqüências da região correspondente ao gene 16S do rRNA, mostrou que os produtos de amplificação das estirpes de *X. campestris* pv. *viticola* e *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* apresentaram homologia com a região 16S do rRNA das bactérias *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* estirpe CNPH411 (número de acesso AY288081.1) e *X. axonopodis* pv. *citri* estirpe LW (número de acesso AF442744.1), *X. campestris* pv. *campestris* (número de acesso AF000946.1) e *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* (número de acesso EF989732), variando de 91 a 99 % de identidade. É importante ressaltar que a espécie *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* foi depositada no GenBank, no dia 22 de junho de 2007, por Ah-You, Gagnevin, & Pruvost (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

A árvore filogenética do gene do 16S rRNA das estirpes das patovares *viticola* e *mangiferaeindicae*, separou em um único grupo as seqüências externas (outgroup) formado por duas estirpes da espécie *Xylella fastidiosa*, a estirpe 9a-5c de citrus (AE009442) e a estirpe Temecula 1 de videira (NC004556). Um segundo grupo foi formado pela espécie *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* pela espécie *X. axonopodis* pv. *citri* e a estirpe IBSBF 1508 de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* isolada de cajueiro. Um único isolado de *X. campestris* pv. *viticola* NCPPB 2475 foi agrupado separadamente das demais estirpes da mesma patovar formando o terceiro grupo. O quarto e último ramo foi formado por *X. campestris* pv. *campestris* (AE11254) e por quatro estirpes de *X. campestris* pv. *viticola* e todas as estirpes de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* utilizadas neste estudo (Figura 16). Pode-se observar que os valores de “bootstrap” dentro do segundo e quarto ramos foram menores que 50 %.

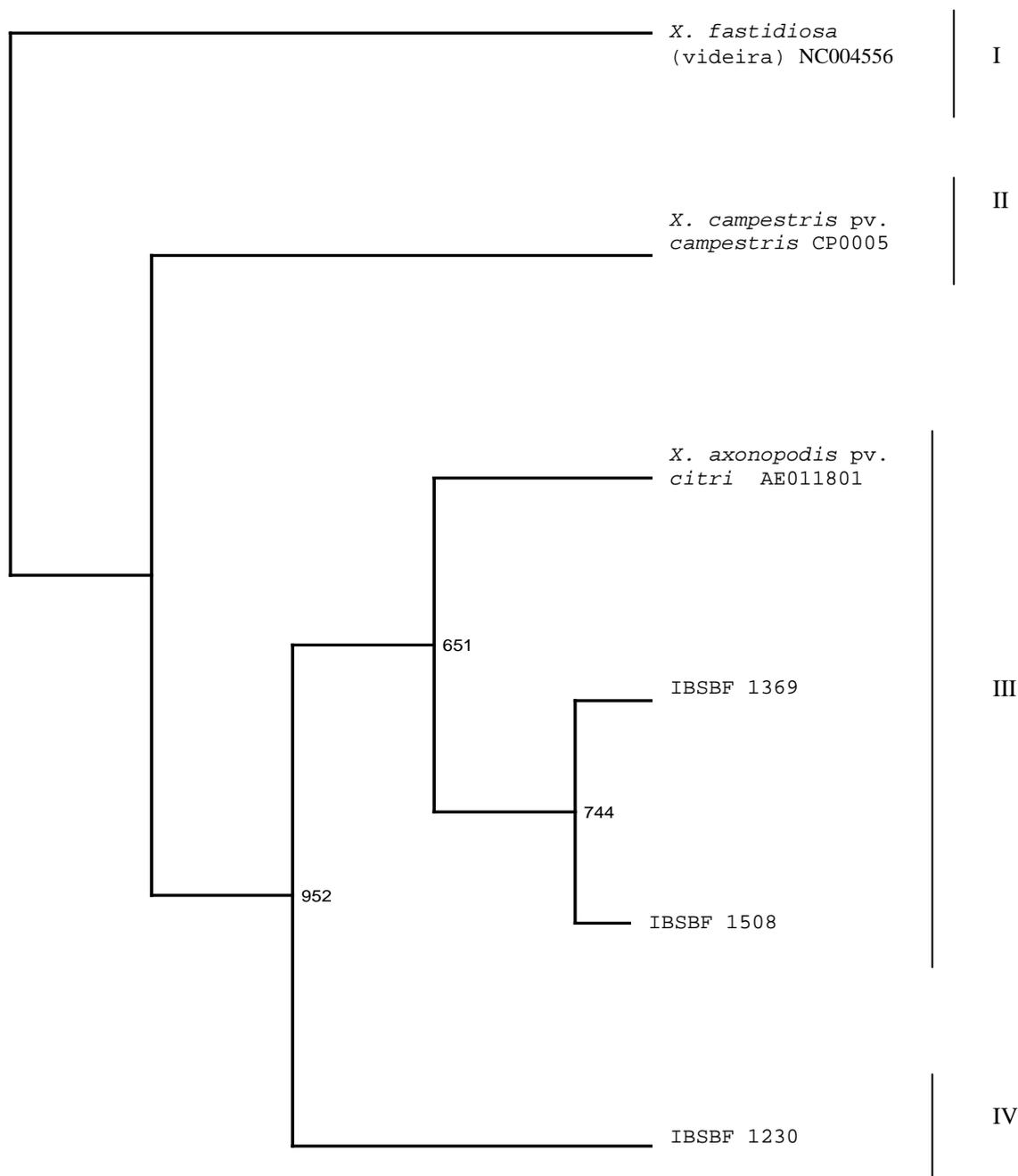


**Figura 16.** Árvore filogenética gerada a partir de seqüências 16S rRNA de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (NCPBP 2475, UnB 1183, UnB 1205, IBSBF 1386, IBSBF 1369), cinco de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (UnB 764, UnB 769, IBSBF 1230, IBSBF 1508, CCP 76) e seqüências depositadas no GenBank de *X. campestris* pv. *campestris* (AE11254); *X. axonopodis* pv. *citri* (DQ991194); *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* (EF989732) e *X. fastidiosa* estirpe 9a-5c (AE009442) e *X. fastidiosa* (NC004556). A árvore consenso foi gerada através do programa Phylip e TreeView e valores de Bootstrap (1000 repetições) estão localizados nos nodos da árvore. A determinação dos grupos filogenéticos está descrito à direita da árvore.

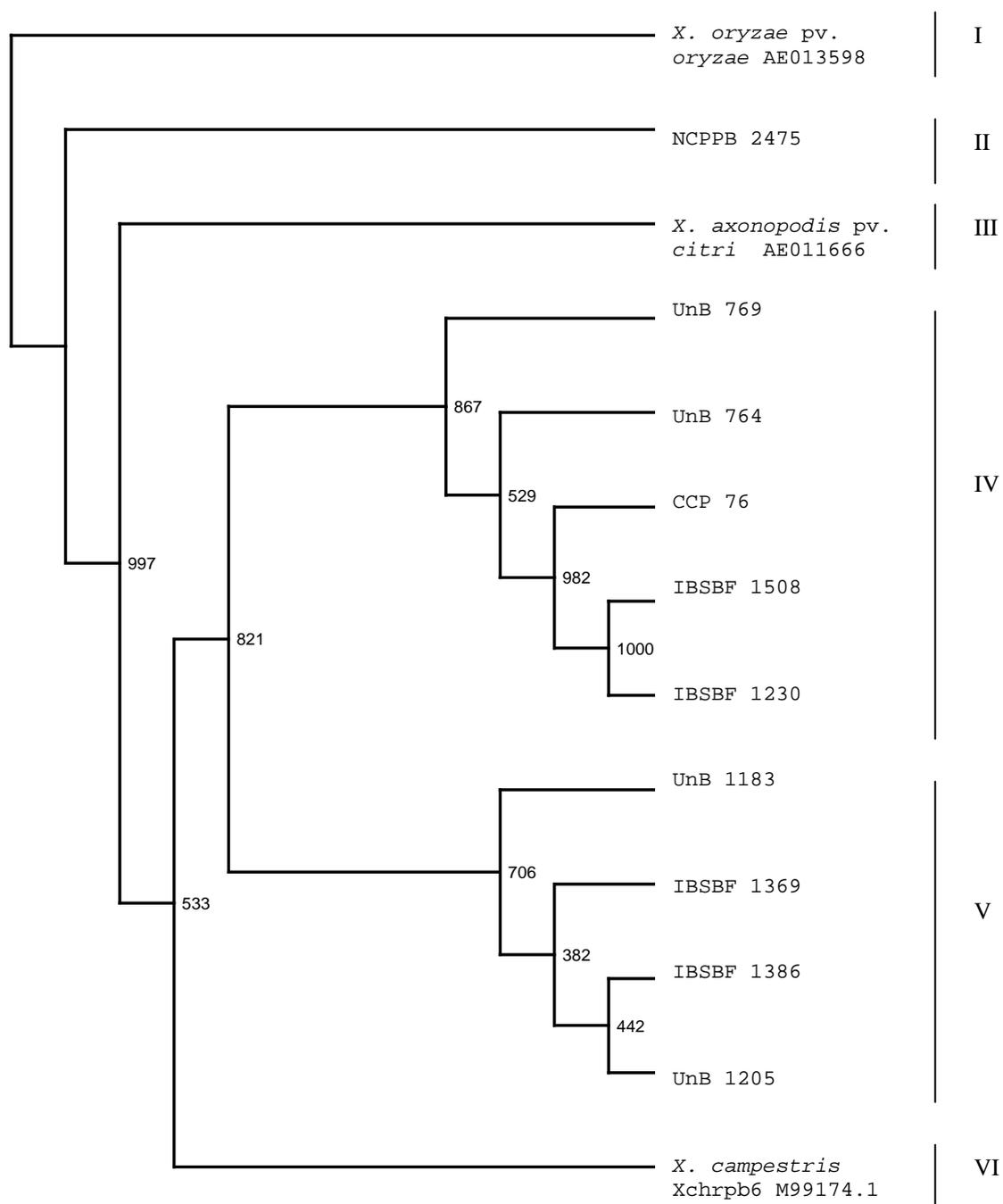
As seqüências citocromo *b561*-like apresentaram baixa qualidade (valor de PHRED baixo). Portanto, para a análise filogenética foram consideradas apenas as seqüências de três estirpes: duas estirpes de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (IBSBF 1230 e IBSBF 1508) e uma de *X. campestris* pv. *viticola* (IBSBF 1369). Para a geração da árvore filogenética foi utilizada a espécie *Xylella fastidiosa* estirpe Temecula 1 de videira (número de acesso NC004556) como grupo externo, compreendendo, portanto, o primeiro agrupamento formado. O segundo grupo foi composto apenas da espécie *X. campestris* pv. *campestris* (número de acesso CP000500). O terceiro agrupamento filogenético compreendeu uma estirpe de *X. campestris* pv. *viticola* (IBSBF 1369) e uma estirpe de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (IBSBF 1508) isolada de cajueiro, juntamente com a espécie *X. axonopodis* pv. *citri*. O quarto grupo formado pela estirpe IBSBF 1230 da pv. *mangiferaeindicae* (Figura 17).

As seqüências obtidas correspondentes à região do gene *hrpB6* das duas patovares em estudo apresentaram alta qualidade, tanto no seqüenciamento realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília quanto no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A árvore filogenética obtidas com as seqüências das dez estirpes de *X. campestris* pv. *viticola* e *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* mostrou seis agrupamentos. Foi utilizado como “outgroup” a espécie *X. oryzae* pv. *oryzae* (número de acesso AE013598). O segundo grupo foi formado apenas pela estirpe NCPPB 2475 de *X. campestris* pv. *viticola*, seguida pelo terceiro grupo formado pela espécie *X. axonopodis* pv. *citri* (número de acesso AE011666). O quarto grupo foi formado por todas as estirpes de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*. O quinto grupo foi composto por todas as estirpes restantes *X. campestris* pv. *viticola*. A espécie *X. campestris* (Xchrpb6\_M99147.1) formou, isoladamente, o sexto grupo mais relacionado

aos grupos IV e V (Figura 18). Pode-se observar que os valores de “bootstrap” foram menores que 50 % apenas, no quinto ramo, entre as estirpes IBSBF 1369, IBSBF 1386 e UnB 1205 de *X. campestris* pv. *viticola*.



**Figura 17.** Árvore filogenética gerada a partir de sequências Citocromo *b561*-like de uma estirpe de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (IBSBF 1369) e duas de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* ( IBSBF 1508, IBSBF 1230) e seqüências depositadas no GenBank de *X. campestris* pv. *campestris* (CP000050); *X. axonopodis* pv. *citri* (AE011801) e *X. fastidiosa* (videira) (NC004556) A árvore consenso foi gerada através do programa Phylip e TreeView e valores de Bootstrap (1000 repetições) estão localizados nos nodos da árvore. A determinação dos grupos filogenéticos está descrito à direita da árvore.



**Figura 18.** Árvore filogenética gerada a partir de sequências *hrpB6* de cinco estirpes de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (NCPPB 2475, UnB 1183, UnB 1205, IBSBF 1386, IBSBF 1369) e cinco de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (UnB 764, UnB 769, IBSBF 1230, IBSBF 1508, CCP 76) e sequências depositadas no GenBank de *X. campestris* pv. *campestris* (XCHRPB6 M99174.1); *X. axonopodis* pv. *citri* XAC (XAC AE011666) e *X. oryzae* pv. *oryzae* (AE013598) A árvore consenso foi gerada através do programa Phylip e TreeView e valores de Bootstrap (1000 repetições) estão localizados nos nodos da árvore. A determinação dos grupos filogenéticos está descrito a direita da árvore.

### 3.3- Análise do perfil plasmidial

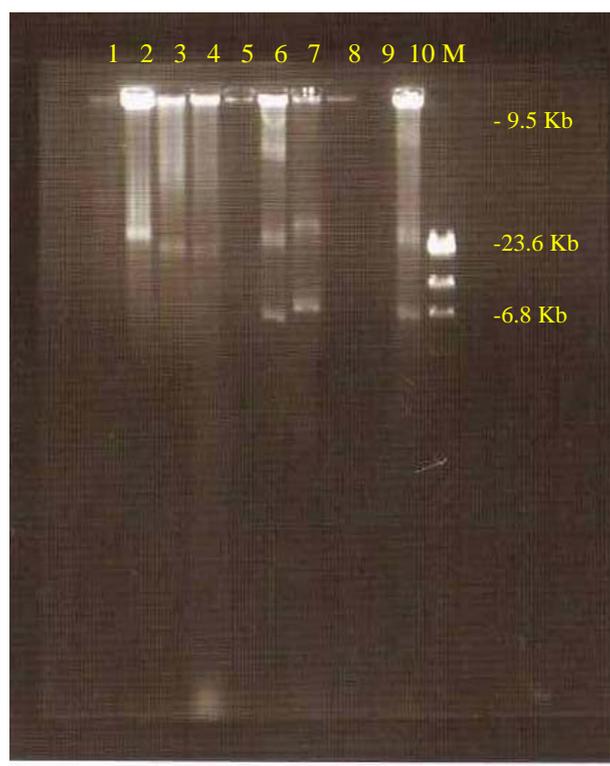
Na separação do DNA através de PFGE foram encontradas diversas dificuldades como o tempo para a resolução em gel de agarose. O método descrito por Jensen *et al.* (1993) foi eficiente mesmo excluindo o uso de fenol durante a etapa de precipitação. O método de Sambrook & Russel (2001) com modificações mostrou a mesma eficiência, porém, pode-se observar uma maior quantidade de DNA plasmidial. Para todos os métodos testados, o DNA era mais visível ou mesmo ausente, mas, de modo geral, o perfil plasmídial para cada estirpe foi o mesmo em todas as três metodologias analisadas, ou seja, o mesmo número e padrão de bandas foi observado.

Em *X. campestris* pv. *viticola* foram detectados plasmídeos em todas as estirpes, exceto na estirpe IBSBF 1369. Nas estirpes NCPPB 2475, UnB 1183 e IBSBF 1386 foi detectado um plasmídeo em cada. Na estirpe UnB 1205 foram detectados dois plasmídeos de tamanhos variados. (Figura 15 e Tabela 10).

Em *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* não foram detectados plasmídeos nas estirpes UnB 764, IBSBF 1230. Nas estirpes UnB 769 e IBSBF 1508 foram detectados dois plasmídeos e na estirpe CCP 76 pelo menos três plasmídeos de tamanhos variados (Tabela 15 e Figura 19).

**Tabela 15.** Número e tamanho estimado dos plasmídeos detectados em *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*

Patovar	Identificação da estirpe	Nº de plasmídeos detectados	Tamanho estimado (Kb)
<i>viticola</i>	NCPPB 2475	1	>23,6
	UnB 1183	1	23,6
	IBSBF 1386	1	23,6
	IBSBF 1369	0	-
	UnB 1205	3	>23,6, >23,6 e 6,0
<i>mangiferaeindicae</i>	UnB 769	2	>23,6
	UnB 764	0	-
	IBSBF 1230	0	-
	IBSBF 1508	2	23,6 e 6,8
	CCP 76	1	> 23,6



**Figura 19.** Eletroforese em gel de agarose 0,6 % (TAE) do DNA plasmidial de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (linha 2- NCPPB 2475; 3-1183; 4-IBSBF 1386; 5-IBSBF 1369; 6- UnB 1205) e *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (linha 1-CCP76;7- UnB 769, 8-UnB 764; 9- IBSBF 1230; 10- IBSBF 1508) extraído a partir do protocolo modificado de Sambrook e Russel (2001). M- Marcador  $\lambda$ DNA digerido com *Hind*III.

#### 4. DISCUSSÃO

Nos testes de patogenicidade cruzada pode-se constatar que *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* infecta artificialmente videira pelos métodos de infiltração no limbo foliar e pelo método pulverização em folhas, sendo este mais semelhante às condições naturais de infecção da bactéria em campo.

Através do método de infiltração e picada, as estirpes de *viticola* e *mangiferaeindicae* causaram sintomas tanto em mangueira como em videira, sendo possível sua recuperação, detecção e identificação por BIO-PCR. Estes resultados sugerem que as duas patovares estão biologicamente relacionadas. Araújo (2001) demonstrou que mediante inoculação artificial empregando-se o método de infiltração foliar com ou sem perfuração, estirpes de *X. campestris* pv. *viticola* provocaram lesões típicas em mangueira.

Além de infectar outras espécies da família *Anacardiaceae*, este estudo sugere que *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* também pode infectar artificialmente plantas de videira. Esta informação é de extrema importância do ponto de vista epidemiológico, uma vez que o cultivo da mangueira é disseminado em toda a região do Submédio do Vale São Francisco, e muitas vezes, próximo aos plantios de uva.

O fato de não ter se conseguido por duas vezes reproduzir os sintomas das duas patovares em plantas de mangueira durante o experimento de inoculação via pulverização, pode estar relacionado às diferenças morfológicas entre as duas espécies de plantas, como as características da superfície e arquitetura das folhas. Outra possibilidade estaria relacionada às condições ambientais do experimento, como temperatura e umidade inadequadas, o que desfavoreceu o desenvolvimento da doença ou mesmo do estabelecimento do patógeno na hospedeira. Segundo Bedendo (1995), os fatores

ambientais podem determinar o grau de predisposição do hospedeiro como também podem ter efeito direto ou indireto sobre o patógeno, favorecendo ou desfavorecendo sua sobrevivência e o seu desenvolvimento, tanto no hospedeiro como no meio ambiente. O termo patovar está vinculado à propriedade de causar doença indicando uma relação estreita entre patógeno e hospedeira. A especialização fitopatogênica tem levantado diversas discussões sobre a taxonomia do grupo *Xanthomonas*, principalmente, dentro da espécie *X. campestris*.

A análise filogenética do gene 16S rRNA de *X. campestris* pv. *viticola* e *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* mostraram que todas as estirpes estariam dentro de um agrupamento próximo a *X. campestris*. Uma seqüência 16S de *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* utilizada neste estudo mostrou estar próxima geneticamente da estirpe IBSBF 1508, isolada de cajueiro, da patovar *mangiferaeindicae*. Ah-You *et al.* (2007) com base em estudos desta região, classificaram *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* como *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* (NCBI). Esta nova classificação pode sugerir que as patovares relacionadas *viticola* e *mangiferaeindicae* não pertençam às espécies *X. campestris* ou *X. axonopodis*.

Segundo Hauben *et al.* (1997), o gene 16S rRNA dentro do gênero *Xanthomonas* é muito conservado, sendo bastante utilizado para a separação taxonômica ao nível do gênero. Porém, Rogall *et al.* (1990) alerta quanto à diminuição da distância evolutiva e à baixa diversidade encontrada neste gene, o que pode comprometer o estudo filogenético entre espécies intimamente relacionadas.

O estudo filogenético da região espaçadora 16S-23S do rDNA das patovares *mangiferaeindicae* e *viticola* revelaram a maior proximidade das estirpes com *X. campestris* pv. *campestris*. Interessantemente, as estirpes UnB 769 e IBSBF 1230, UnB

1205 e UnB 1183, tanto na análise filogenética baseada no 16S rRNA como na região ITS, formaram dois subgrupos. Os resultados demonstram que existe uma proximidade genética inter e intra patovar. Segundo Gonçalves (2000), a região espaçadora 16S-23S apresenta 10% a mais de variação em relação ao gene 16S, no entanto, Gonçalves & Rosato (2002) obtiveram árvores filogenéticas da região 16S e da região ITS bastante parecidas.

A árvore filogenética gerada com as seqüências do gene citocromo *b561*-like de três estirpes das patovares *viticola* e *mangiferaeindicae* comparada às estirpes depositadas no Genbank permitiu inferir que ambas as patovares estão mais próximas a *X. axonopodis* que *X. campestris*. Segundo Duan & Gabriel (2004) o estudo da região do citocromo *b561*-like para fins filogenéticos tem alta resolução para a tipagem de estirpes ao nível de patovar e espécie. No entanto, existem poucos estudos referentes a esta região.

A análise filogenética da região *hrpB6* mostrou uma alta proximidade entre as duas patovares. Os resultados obtidos corroboram os resultados referentes à amplificação positiva com os iniciadores baseados na região *hrpB6* desenhados para *X. campestris* pv. *viticola*, uma vez que também se amplificou o DNA de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*. Pode-se observar que as estirpes estudadas se encontram mais próximas de *X. campestris* pv. *campestris*. Segundo Cornelis & Van Gijsegem (2000) os genes *hrp* são altamente conservados entre bactérias patogênicas, entre elas *Xanthomonas*. Estes genes são essenciais para a patogenicidade e conseqüentemente para a multiplicação bacteriana no hospedeiro (Alfano & Collmer, 1997).

Estudos de seqüências parciais do gene *copA*, identificado em estirpes de *X. campestris* pv. *viticola*, sugeriram maior proximidade com *X. axonopodis* pv. *citri* do que com *X. campestris* (Marques, 2007). Takita *et al.* (2004) estudando a região *rpf* também sugeriram que a patovar *viticola* estaria mais próxima a *X. axonopodis*.

Os resultados deste trabalho, baseados na análise das regiões ITS, 16S rRNA e *hrpB6* sugerem que as estirpes estudadas das duas patovares estão filogeneticamente mais próximas a *X. campestris* pv. *campestris*, e que são altamente relacionadas entre si. As patovares foram mais próximas filogeneticamente à *X. axonopodis* pv. *citri* apenas para a região semelhante ao citocromo *b561*, corroborando o trabalho de Takita *et al.* (2004). Na análise dos genes 16S rRNA e *hrpB6* observou-se agrupamentos de estirpes de *viticola* e *mangiferaeindicae* segundo a hospedeira de origem, mas isso não foi observado para a região ITS.

Este é o primeiro relato da presença de pelo menos um plasmídeo entre as estirpes de *X. campestris* pv. *viticola* estudadas. Segundo Lazo & Gabriel (1987) a presença de plasmídeos pode ser utilizada para diferenciar estirpes de *X. campestris* ao nível de patovar. O estudo da presença ou não de plasmídeos em estirpes de *Xanthomonas* tem grande relevância em estudos epidemiológicos. Vivian *et al.* (2001), sugerem que os plasmídeos presentes em fitobactérias estão intimamente relacionados com a interação planta-patógeno. Estudos realizados por Lazo & Gabriel (1987) detectaram a presença de dois plasmídeos em duas das quatro estirpes de *X. campestris* pv. *campestris* e nenhum plasmídeo em *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*. Neste estudo, das cinco estirpes de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* analisadas, duas não apresentaram nenhum plasmídeo. Stripecke & Rosato (1988) não detectaram nenhum plasmídeo nas estirpes de *X. campestris* pv. *campestris*, três plasmídeos em todas as estirpes de *X. axonopodis* pv. *citri* e dois a três plasmídeos em *X. campestris* pv. *manihotis*.

Pode-se observar que as estirpes de *X. campestris* pv. *viticola* apresentaram o mesmo número de plasmídeos de tamanhos próximos, em torno de 23.6Kb, uma única estirpe não apresentou nenhum plasmídeo e a estirpe isolada no ano de 2000 apresentou

três plasmídeos de tamanhos variados. Os plasmídeos podem carregar diversos genes de resistência, tais como a resistência ao cobre e antibióticos. Estudos preliminares baseados em hibridização usando como sonda o gene *copA*, sugeriram que em *X. campestris* pv. *viticola* e *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*, o gene *copA* estaria localizado no cromossomo (dados não mostrados). Segundo Maciel *et al.* (1998), nenhum dos plasmídeos das estirpes de *X. axonopodis* pv. *citri* possuíam o gene de resistência (pCUR2) sugerindo que estes genes poderiam estar localizados no cromossomo.

Segundo Gabriel (1985) a variação dos perfis plasmidiais podem ser indicativo de diferentes introduções. Maciel *et al.* (1998) detectaram a presença de plasmídeos em 16 das 21 estirpes estudadas de *X. axonopodis* evidenciando três grupos. A alta variabilidade do número de plasmídeos encontrados entre as estirpes de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* indicam a heterogeneidade da patovar, já evidenciada no Capítulo 2. Kenichi *et al.* (2004) na caracterização de antissoros monoclonais contra *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*, observaram a existência de dois grupos fenotípicos e sorologicamente diferentes. Weingart & Volksch (1997) sugerem que a heterogeneidade genética pode refletir adaptações ambientais. Trindade *et al.* (2005) através da análise combinada das seqüências repetitivas REP, ERIC e BOX-PCR detectaram polimorfismo dentro da patovar *viticola* de *X. campestris*, o que pode estar relacionado com a natureza da introdução bem como à adaptação do patógeno às condições ambientais.

Estudos futuros quanto à localização de genes e, mesmo o seqüenciamento e caracterização de cada um desses plasmídeos, podem contribuir para o conhecimento da capacidade de adaptação, patogenicidade e sobrevivência das duas patovares.

## CONCLUSÕES GERAIS

---

- 1- A combinação de oligonucleotídeos iniciadores RST2/Xcv3R e Xcv1F/Xcv3R pode ser utilizada para detecção de *X. campestris* pv. *viticola* via PCR.
- 2- O uso de Nested-BIO-PCR com os iniciadores RST2/Xcv3R e Xcv1F/Xcv3R foi eficiente para a detecção de *X. campestris* pv. *viticola* em plantas assintomáticas e sintomáticas. O método permitiu a detecção e identificação de *X. campestris* pv. *viticola* em 72 horas, tempo menor se comparado aos métodos convencionais.
- 3- Estirpes de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* foram patogênicas à videira pelo método de infiltração, picada e pulverização. Pelo método de infiltração e picada, as estirpes de *X. campestris* pv. *viticola* foram patogênicas à mangueira. Porém, não se constatou a patogenicidade de *X. campestris* pv. *viticola* à mangueira pelo método de pulverização.
- 4- A análise filogenética mostrou que, independente da região seqüenciada e analisada, as patovares *viticola* e *mangiferaeindicae* de *X. campestris* então intimamente relacionadas, e próximas a *X. campestris* e *X. axonopodis*. Confirmou-se ainda que todas as estirpes analisadas pertencem ao gênero *Xanthomonas*.
- 5- O estudo do perfil plasmidial mostrou alta variabilidade entre as dez estirpes e entre as duas patovares, com a presença de plasmídeos variáveis em número e tamanho. A caracterização desses plasmídeos poderá esclarecer aspectos de sua função na adaptação, patogenicidade e sobrevivência dessas bactérias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

AGUIAR, I.F.; SILVA, V.A.V.; COSTA, G.S.O. & NASCIMENTO, A.R.P. Resistência a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em cultivares de videira no Vale do São Francisco. **Fitopatologia Brasileira** 26: 282.2001.

AH-YOU, N., GAGNEVIN, L., GRIMONT, P.A., BRISSE, S., NESME, X., CHIROLEU, F., BUIHINGOC, L., JOUEN, E., LEFEUVRE, P., VERNIERE, C. & PRUVOST, O. Polyphasic characterization of xanthomonads pathogenic to *Anacardiaceae* and their relatedness to different *Xanthomonas* species. 2007. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Data da consulta: 10 de agosto de 2007.

ALFANO, J.R. & COLLMER, A. The type III (*hrp*) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins and death. **Journal of Bacteriology** 179: 5655-5662. 1997.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology** 215: 403-410. 1990.

ALVAREZ, A.M. Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. **Annual Review Phytopathology** 42: 339-366.2004.

AMORIM, L. & KUNIYUKI, H. Doenças da videira (*Vitis* sp.). In Manual de Fitopatologia. Volume 2: **Doenças de Plantas Cultivadas**. KIMATI, H; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO; CAMARGO, L.E.A., REZENDE, J.A.M. (Eds.). Ceres. 1997. pp.736-757.

ARAÚJO, J.S. de P.; OLIVARES, F.L.; ROBBS, C.F.; RIBEIRO, R.L.D & AKIBA, F. Sobrevivência epífita de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videira. **Fitopatologia Brasileira** 25: 319. 2000. (Resumo).

ARAÚJO, J.S. de P.; REIS-JUNIOR, F.B. dos; CRUZ, G.B.; OLIVEIRA, B.C. DE; ROBBS, C.F.; RIBEIRO, R. de L. D. & POLIDORO, J.C. Produção e caracterização de anticorpos policlonais contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 40(3): 305-309. 2005.

ARAÚJO, J.S. de P.; ROBBS, C.F. & RIBEIRO R.de L.D. Manejo integrado de fitobacterioses de importância econômica no Brasil. Parte 2. RAPP. **Revisão Anual de Fitopatologia de Plantas** 12: 145-199. 2004.

ARAÚJO, J.S.P. Perfil epidemiológico e subsídios para controle de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, agente do cancro bacteriano da videira (*Vitis vinifera* L.) no Brasil. **Tese de Doutorado**. Rio de Janeiro. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2001.

ARAÚJO, J.S.P.; ROBBS, C.F. & MACIEL, G.F. Novos hospedeiros alternativos de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* no Brasil. **Summa Phytopathologica** 25:83. 1999.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A. & STRUHL, K. (Eds.) **Short protocols in molecular biology**. 2<sup>nd</sup> ed. London: John Wiley & Sons. 1992.

AZEVEDO, J.L. de. Herança extracromossômica nos microrganismos. IN: AZEVEDO, J.L.de (Eds.) **Genética de Microrganismos**.1<sup>o</sup> Ed. Goiânia. Editora Universidade Federal de Goiás. 1998. pp. 490.

BARAK, J.D. & GILBERTSON, R.L. Genetic diversity of *Xanthomonas campestris* pv, *vitians*, the causal agent of bacterial leafspot of lettuce. **Phytopathology** 93: 596-603. 2003.

BEDENDO, I.P. Ambiente e doença. In: **Manual de Fitopatologia**. Bergamin Filho, A.; Kimati, H. & Amorim, L.(Eds.). SãoPaulo.Ceres.1995. pp.331-341.

BERESWILL, S.; PAHL, A.; BELLEMAN, P., ZELLER, W. & GEIDER, K. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. **Applied and Environmental Microbiology** 58: 3522-3526. 1992.

BERIAN, L.O.S.; ROBBS, C.F. & RODRIGUES NETO, J. Galha bacteriana (*Agrobacterium* sp.) em videira no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica** 18: 47. 1992.

BRADBURY, J.F. Guide to plant pathogenic bacteria Kew: C.A.B. International. 332. 1986.

BRADBURY, J.F. *Xylophilus ampelinus*. IMI. Descriptions of fungi and bacteria. N° 1050. **CAB International**. U.K. 1991.

BRAGA, J.P. & FERREIRA, M.A.S.V. Caracterização bioquímica e círculo de hospedeiras de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, agente causal do cancro bacteriano da videira (*Vitis vinifera*). **Anais do Congresso de Iniciação Científica da Universidade de Brasília** 80. 2000. (Resumo)

CAMARGO FILHO, W. P. de, ALVES, H. S. & MAZZEI, A. R. Mercado de manga no Brasil: contexto mundial, variedades e estacionalidade. **Informações Econômicas**, São Paulo 34. 2004.

CAMARGO, U. A. Melhoramento genético: variedades de uvas sem sementes para o Brasil. **X Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia**. (Disponível URL: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=16772>) Bento Gonçalves– RS. 2003. p.170.

CARVALHO, F.M. de S. Expressão gênica em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* controlada por promotores induzidos pela planta hospedeira. **Tese de Doutorado**. Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. 2006.

CHAN, J.W.Y.F & GOODWIN, P. H. The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology Advances** 17 (6), 489-508. 1999.

CHAND, R. Sources of resistance to grapevine bacterial canker disease in *Vitis*. **Indian Journal of Horticultural Research**, Bangalore, v. 31, p. 83-86, 1992.

CHAND, R.; PATIL, B.P. & KISHUM, R. Management of bacteril canker disease (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*) of grapevine (*Vitis vinifera*) by pruning. **Indian Journal of Agriculture Science** 61: 220-222. 1991.

CHAND, R.; SINGH, P.N.; SINGH, D. & SINGH, R. Copper and streptomycin resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Journal of Plant Disease Protection** 101: 487-491. 1994.

COLLMER, A.; LINDEBERG, M.; PETRICHI-OCWEIJA, T.; SCHNEIDER, D.J. & ALFANO, J.R. Genomic Type II secretion system efectors in *Pseudomonas syringae* yields new picks for all TTSS prospectors. **Trends in Microbiology** 10: 462-469.2002.

CORNELLIS, G. R. F & Van GIJSEGIN. Assembly and function of type III secretory systems. **Annual Review of Microbiology** 54: 735-774. 2000.

CORREIA, R.C. **Alterações na agricultura irrigada**. Data 2000. <http://www.agr.feis.unesp>. Data da consulta: 20 de março de 2007.

CUNHA, M.M.; FILHO SANTOS, H.P & NASCIMENTO, A.S. Do (Org.) **Manga Fitossanidade**. Embrapa Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas, BA). 2000. pp.64-67.

DEMEKE, T & ADAMS, R.P. The effects of plant polysaccharides and buffer additives of PCR. **Biotechniques** 12:332-334. 1992.

DESAI, S.G., GANDHI, A.B., PATEL, M.K. & KOTASTHANA, W.V. A new bacterial leaf-spot and blight of *Azadirachta indica* A. Juss. **Indian Phytopathology** 19:322-323. 1966.

DESTÉFANO, S. A.L. Detecção e identificação de bactérias fitopatogênicas através da utilização de *primers* específicos. **Summa Phytopathologica** 26:158-160. 2000.

DIAS, J.C. Centesimo Curso Intensivo de Vinificação. . **Ministério da Agricultura e Desenvolvimento Rural**: 1-3. 2006

DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus, Gaithersburg** 12:13-15. 1987.

DUAN, Y.P. & GABRIEL, D.W. Cytochrome *b561*-like genes are useful in identification of *Xanthomonas* estirpes. **Phytopathology** 94(6):527. 2004.

DYE, D.W. Genus *Xanthomonas* Dowson 1939. In Young, J.M. Bradbury, J.F., Panagopoulos, C.G.; Robbs, C.F. (Eds.) **A proposed nomenclature and classification for pathogenic bacteria**. N.Z.J. Agric. Res 21:153-177. 1978.

ERWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C. & GREEN, P. Base-calling of automated sequence using Phred.I. Accuracy Assessment. **Genome Research** 8(3):175-185. 1998.

FASSLER, J., NADEL, C., RICHARDSON, N., MCENTYRE, J., SCHULER, G., McGINNIS, S., PONGOR, S. & LANDSMAN, D. **BLAST**. (URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Education/BLASTinfo/information3.html>) Consultado em 18 Junho de 2007.

FATMI, M.; DAMSTEEGT, V.D. & SCHAAD, N.W. A combined agar-absorption and BIO-PCR assay for rapid, sensitive detection of *Xylella fastidiosa* in grape and citrus. **Plant Pathology** 54:1-7. 2005.

FELSENSTEIN, J. PHYLIP (**Phylogeny Interface Package**) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle. 2005

FERREIRA, M.A.S.V.; BRAGA, J.P., FRANÇA, C.D.; UESUGI, C.H & LIMA, F.M. Caracterização bioquímica de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira** 25. 459. 2000. (Resumo).

CAMARGO FILHO, W. P.; ALVES, H. S.; MAZZE, A. R. **Mercado de manga no Brasil: Contexto mundial, variedades e estacionalidade**. Informações Econômicas São Paulo. 34: maio. 2004.

FREIRE, F. das C. O & OLIVEIRA, A D. S. Ocorrência do cancro bacteriano da videira no Estado do Ceará. Embrapa. Fortaleza CE. **Comunicado Técnico** n. 62. 2001.

FUQUA, C. Biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annual Review of Microbiology** 61,1 -401, 2007.

GABRIEL, D.W. Four plasmid DNA Variants distinguished in 1984 Florida Citrus canker epiphytotic. **Phytopathology** 75: 1320. 1985 (Resumo).

GAGNEVIN, L.; LEACH, J.E. & PRUVOST, O. Genomic variability of the *Xanthomonas* pathovar *mangiferaeindicae* of mango bacterial black spot. **Applied Environmental Microbiology** 63:246-253. 1997.

GARRITY, G. M., WINTERS, M. & SEARLES, D.B. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Michigan State University. 2<sup>nd</sup> Ed. 2001.

GONÇALVES, E.R. & ROSATO, Y. B. Genotypic characterization of xanthomonad estirpes isolated from passion fruit plants (*Passiflora* spp.) and their relatedness to different *Xanthomonas* species. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology** 50:811-821. 2000.

GONÇALVES, E.R. & ROSATO, Y.B. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species based upon 16S-23S rDNA intergenic spacer sequences. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology** 52:355-361. 2002.

GONÇALVES, E.R. *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*: taxonomia polifásica, filogenia e detecção. UNICAMP. **Tese de Doutorado**. Campinas, SP. 2000.

HALFELD-VIEIRA, B.A. & NECHET, DE L.K. Bacterial canker of grapevine in Roraima, Brazil. **Fitopatologia Brasileira** 31:604. 2006.

HAUBEN, L.; VAUTERIN, L.; SWINGS, J. & MOORE, E.R.B. Comparison of 16S ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. **International Journal of Systematic Bacteriology** 47(2):328-335.1997.

HENSON, J.M & FRENCH, R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. **Annual Review Phytopatology** 31:81-109.1993.

**INSTRUÇÃO NORMATIVA nº 09, 2006**. Ministério da Agricultura e Abastecimento. (Disponível URL: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/> Consultado em 25/07/2007.

**INSTRUÇÃO NORMATIVA nº 181, 1999**. Ministério da Agricultura e Abastecimento. (Disponível URL: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/> Consultado em 10/10/2007.

**INSTRUÇÃO NORMATIVA SDA nº 38, 1998**. Ministério da Agricultura e Abastecimento. (Disponível URL: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/> Consultado em 25/07/2007

JENSEN, G.B.; WILKS, A.; PETERSEN, S.S.; DAMAGAARD, J,BAUM, J.A & ANDRUP, L. The genetic basis of the aggregation system in *Bacillus thuringiense* subsp. *israelensis* is located on the large conjugative plasmid pXO16. **Journal of Bacteriology** 177:2914-2917. 1995.

JENSEN, M.A.; WEBSTER, J.A. & STRAUS, N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction – Amplified Ribosomal DNA Spacer polymorphisms. **Applied and Environmental Microbiology** 59(4): 945-952. 1993.

JUNQUEIRA, N.T.V.; JUNQUEIRA, K.P.; BRAGA, M.F.; VAZ, C.F.; SANTOS, E.C.; JUNQUEIRA, L.P.; SOUZA, L.S.; LIMA, C.A. Ocorrência do cancro bacteriano da videira na região do entorno do Distrito Federal.. In: **XIX Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2006, Cabo Frio - RJ**. Frutas do Brasil: saúde para o mundo. Palestras e Resumos.. Cabo Frio - RJ: SBF/UENF/UFRural RJ. 2006. p. 323.

KADO, C.I. & HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. **Phytopathology** 60:969-976. 1970.

KENICHI, T.; D'URSEL, C.C. M.O. & YUSO, N. Production and preliminary Characteization of monoclonal antibodies raised against *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*. **Journal of General Plant Pathology** 70:27-33.2004.

KERKOU, M.; MANCEAU, C. & PAULIN, J.P. Rapid diagnosis of *Pseudomonas syringae* pv. *populans*, the causal agent of blister spot of apple, by polymerse chain reaction using specifically designed hrpL genes primers. **Phytopathology** 92:1077-1083. 2002

KIMURA, M. A simple method fore estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. **Journal of Molecular Evolution** 16:11-120. 1980

KISHUM, R. & CHAND, R. Studies on germoplasm resistance and chemical control of Citrus canker. **Indian Journal of Horticulture** 44, 126-132.1987.

KOCHENKO, Z-I. Development of canker tumours on grape roots. **Zashchita-Rastenii-Moskva** 7:42-43. 1993.

LACERDA, B.S.L; OLIVEIRA, J.L.; ROMEIRO, R.S. & BROMMONSHENKEL, S.H. Ocorrência de galha em videira incitada por *Agrobacterium*. **Fitopatologia Brasileira** 16(2): 47.1991.

LAZO, G.R & GABRIEL, D.W. Conservation of plasmid DNA sequences and pathovar indentification of estirpes of *Xanthomonas campestris*. **Phytopathology** 77:448-453.1987.

LEÃO, P.C. de S & POSSÍDIO, E.L. de. Histórico da videira. In: Leão, P.C. de S. & Soares, J.M.S (Eds). **A viticultura no Semi-Árido brasileiro**. Petrolina PE. Embrapa SemiÁrido. 2000. pp. 13-32.

LEITE JR., EGEL, D.S. & STALL R.E. Genectic analysis of hrp related DNA sequences of *Xanthomonas campestris* estirpes causing diseases of citrus. **Applied and Environmental Microbiology** 60(4):1078-1086. 1994a.

LEITE JR., R.P.; JONES, J.B. & SOMONDI, G.C. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* associated with pepper and tomato seed by DNA amplification. **Plant Disease** 79(9):917-922. 1995.

LEITE JR., 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** 60:1068-1077, 1994b.

LELLIOTT, R.A & STEAD, D.E. Methods for diagnosis of bacterial diseases plants. In: LELLIOTT, R. A.; STEAD, D. E. **Methods in plant pathology**. Oxford. Blackwell Sci. 2:216.1987.

LIMA, M. F.& FERREIRA, M. A. S. V. Infecção latente em porta-enxerto de videira causada por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Summa Phytopathologica** 26 (1) 127. 2000b. Resumo.

LIMA, M.F. & MASHIMA, C. Tratamento químico e térmico de bacelos de videira infectados com *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira** 25. 324.2000.

LIMA, M.F.; FERREIRA, M.A.S.V. & DIANESE, J.C. Situação do cancro bacteriano da videira causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* no Submédio do Vale do São Francisco. **Fitopatologia Brasileira** 24: 250. 1999a.

LIMA, M.F.; FERREIRA, M.A.S.V.; MOREIRA, N.A. & DIANESE, J.C. Bacterial canker of grapevine in Brazil. **Fitopatologia Brasileira** 24(3):440-443. 1999b.

LINDGREN, P.B.; PEET, R.C. & PANOPOULOS, N.J. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. **Journal of Bacteriology** 168:512-522. 1986.

LOPES, D.B.L. & NASCIMENTO, A.R.P. Situação atual do cancro bacteriano da videira no semi-árido nordestino. IN: **Seminário Novas Perspectivas para o Cultivo de Uvas Sem Sementes no Vale do São Francisco**. Junho de 2004. Petrolina. Embrapa Semi-Árido (Documento 185).

LOPES, D.B; LEÃO, P.C. DE SOUZA & SILVA, D.J. Ocorrência de cancro bacteriano em cinco variedades de uvas apirênicas. **Fitopatologia Brasileira** 29:60. 2004. (Resumo)

LOUWS, E.J.; RADEMAKER, J.L.W. & de BRUIJN, F.J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology** 37:81-125. 1999.

MACIEL, J.L.N.; DUARTE, V. & AYUB, M.A.Z. Plasmid and restriction profile and copper sensitivity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Rio Grande do Sul, Brazil. **Fitopatologia Brasileira** 23(2):116-120. 1998.

MAES, M.; GARBEVA, P. & KAMOEN, O. Recognition and detection in seed of the *Xanthomonas* pathogens that cause cereal leaf streak using rDNA spacer sequences and polymerase chain reaction. **Phytopathology** 86 (1):63-69. 1996.

MALAVOLTA JR, V.A.; ALMEIDA, I.M.G.; ALMEIDA; SUGIMORI, M.H.; RIBEIRO, I.J.A.; NETO, J.R.; PIRES, E.J.P. & NOGUEIRA, E.M.C. Ocorrência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videira no Brasil. **Summa Phytopathologica** 25: 262-264. 1999a

MALAVOLTA JR., V.A.; ALMEIDA, J.M.G.; SUGIMORI, M.H.; RIBEIRO, I.J.A.; RODRIGUES NETO, J.; PIRES, E.J.P. & NOGUEIRA, E.M.C. *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videira no Estado do Piauí. **Summa Phytopathologica** 25:89. 1999b

MALAVOLTA JR., V.A.; ALMEIDA, J.M.G.; SUGIMORI, M.H.; RIBEIRO, I.J.A.; RODRIGUES NETO, J.; PIRES, E.J.P. & NOGUEIRA, E.M.C. Ocorrência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videira no Brasil. **Summa Phytopathologica** 25 (3).262-264. 1998.

MALAVOLTA JR., V.A.; SUGIMORI, M.H.; ALMEIDA, I.M.G. & RIBEIRO, I.J.A. Resistência de variedades de videira a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Arquivos do Instituto Biológico** 70(3):373-376. 2003.

**MAPA**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa n° 38 de 14 de outubro de 1999. Lista de Pragas Quarentenárias A1, A2 e Não Quarentenárias Regulamentadas - Alerta máximo. Diário Oficial da União, Seção 1, Página 0, Brasília, 26/10/1999.

MARIANO, R.L. & SILVEIRA, E.B. Quantificação de inóculo de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, L.R. & SILVEIRA, E.B. (Ed.) **Manual de práticas em Fitobacteriologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2005. p. 47-50.

MARIANO, R.L. & ASSIS, E.M.P. Inoculação de bactérias fitopatogênicas. In MARIANO, R.L.R. (Ed.) **Manual de práticas em fitobacteriologia**. UFPE, Recife. pp.109-110. 2000.

MARQUES, E. Variabilidade e tolerância ao cobre em *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* agente causal do cancro bacteriano da videira *Vitis* spp. **Dissertação de Mestrado**. Brasília DF. Universidade de Brasília. 2007.

MARQUES, E.K.; IKUTA, N.; LUNGE, V.R. & FONSECA, A.S.K. Diagnóstico molecular e biotecnologia. IN: **Biotecnologia: Avanços na agricultura e na agroindústria**. Serafini, A. L.; Barros, N.M. & Azevedo, J.L. (Org.). 102-163p. Caxias do Sul: EDUCS. 2002.

MARTIN, R.R.; JAMES, D. & LÉVESQUE, C.A. Impact of molecular diagnostic technologies on plant disease management. **Annual Review of Phytopathology** 38:207-239. 2000.

MARTINATI, J.C. Análise filogenética de linhagens de *X. fastidiosa* de diferentes hospedeiros baseado na seqüência da região intergênica 16S-23S rDNA. **Dissertação de Mestrado**. Rio Claro SP. 2003.

MARTINS, O.M. Polymerase chain reaction in the diagnosis of bacterial wilt, caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* **Tese de Doutorado**. Gottingen. 2000.

MELLO, L.M. R. de. **Viticultura Brasileira: Panorama 2006**. Artigo técnico disponibilizado em 04/04/2007 na página <http://www.cnpuv.embrapa.br>. Data da consulta 18/04/2007.

MINSAVAGE, G.V. THOMPSON, C.M.O. HOPKINS, D.L., LEITE, R.M.V.B.C. & STALL, R.E.. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. **Phytopathology** 84: 456-461. 1994

MOLTMANN, E. & ZIMMERMANN, C. Detection of *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry plants by nested-PCR. **Bulletin OEPP/EPPO** 35:53-54. 2005.

MOORE, E.R.B.; KRUGER, A.S.; HAUBEN, I.; SEAL, S.E.; de BAERE, R.; WACHTER, R.; TIMMIS, K.N. & SWINGS, J. 16S rRNA gene sequence analysed and inter-intragenic relationships of *Xanthomonas* species and *Stenotrophomonas maltophilia*. **FEMS Microbiology Letters** 151:145-153. 1997.

MOREIRA, W.A.; PEREIRA, A.V.S. KARASAWA, M. & ANTUNES JR, E.F.. Efeito da inoculação de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em plantas de uva. **Fitopatologia Brasileira** 31:282. 2006.

MOURA, A.B. & ROMEIRO, R. S. Detecção e quantificação de *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* em lotes de sementes de pepino. **Revista Brasileira de Sementes** 15:183-186. 1993.

NASCIMENTO, A.R.P. & MARIANO, R. de L. Cancro bacteriano da videira: etiologia, epidemiologia e medidas de controle. **Ciência Rural** 34:301-307. 2004.

NASCIMENTO, A.R.P. Cancro bacteriano (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*) da videira (*Vitis* spp.): métodos de preservação e crescimento de isolados; escala diagramática e reação de variedades de videira à doença. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2005.

NASCIMENTO, A.R.P.; AGUIAR, I.F.; SILVA, V.A.V.; CASTRO, G.S.S.; PAZ, C.D.. Ocorrência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em porta-enxertos de videiras. **Fitopatologia Brasileira** 25:326. 2000.

NASCIMENTO, A.R.P.; SILVA, V.A.V. MONTEIRO, L.C. AGUIAR, I.F. & CASTRO, G.S.S. *Azadirachta indica* – Hospedeiro alternativo de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* no submédio do Vale do São Francisco. **Fitopatologia Brasileira** 26:282. 2001.

NASCIMENTO, A.R.P; MARIANO,R.L.R. & GAMA, MA.S. Método de preservação e crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em meio de cultura variando temperatura, pH e concentração de NaCl. **Fitopatologia Brasileira** 36(6):650-654. 2005.

NAYUDU, M.V. *Pseudomonas viticola* sp. nov., incitant of a new bacterial disease of grapevine. **Phytopathologische Zeitschrift** 73:183-186. 1972.

OLIVEIRA, J.R.; ROMEIRO, R.S & LACERDA, B.S.L. Occurrence of *Agrobacterium tumefaciens* biovar B on grapevine in Brazil. **Journal of Phytopathology** 140:363-366. 1994.

PAGE, R.D.M. TreeView Tree drawing software for apple Macintosh and Microsoft windows, version 1.5.2. **Institute Biomedical & Life Sciences**. University of Glasgow, Scotti UK. 1998.

PAGE, R.D.M. **TreeView Tree drawing software for apple Macintosh and Microsoft windows, version 1.5.2**. Institute Biomedical & Life Sciences. University of Glasgow, Scotti UK. 1998.

PALLERONI, N.J.; HILDEBRAND, D.C.; SCHROTH, M.N & HENDSON, M. Deoxyribonucleic acid relatedness of 21 strains of *Xanthomonas* species and pathovars. **Journal of Applied Bacteriology** 75:441-446. 1993.

PAN, Y.-B.; GRISHAN, M.P.; BERNER, D.M; LEGENDRE, B.L. & NEI, Q. Development of polymerase chain reaction primers highly specific for *Xanthomonas albilineans*, the causal bacterium of sugarcane leaf scald disease. **Plant Disease** 83(3):218-222. 1999.

PARK, D.S., SHIM, J.K.; KIM, J.S.; LIM, C.K.; SHRESTHA, R.; HAHN, J.H. & KIM, H.G. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by PCR using pathovar-specific primers based on rhs family gene sequences. **Microbiological Research**. 2007, Publicação on line: <http://www.Elsevier.de/micress>.doi:10.1016/j.micres.2006.11.005

PATEL, M. K. MONIZ, L. & KULKARNI, Y.S. A new bacterial disease of *Mangifera indica* L. **Current Science** 17:189-190. 1948.

PATEL, M.K. & KULKARNI, Y.S. A new bacterial leaf spot on *Vitis woodrowii* Stapt. **Current Science** 20,132.1951

PEARSON, C. & GOHEEN, R. (Eds) **Compendium of grape diseases**. APS Press. 4<sup>nd</sup>.ed. 1998.

PEIXOTO, A.R., MARIANO, R.L.R. & VIANA, I.O. Meio semi-seletivo para isolamento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Ciência Rural** 36:1317-1320. 2006.

PEIXOTO, A.R., MARIANO, R.L.R., MOREIRA, J.O.T. & VIANA, I.O. Hospedeiros alternativos de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira** 32:161-164. 2007.

POMMER, G.V. & MAIA, M.L. Introdução. IN: Manica, I (Ed.) **Uva tecnologia de produção, pós-colheita, mercado**. Porto Alegre. Editora Cinco Estrelas. 2003. pp. 11-35.

POUSSIER, S. & LUISETTI, J. Specific detection of biovars of *Ralstonia solanacearum* in plant tissues by Nested-PCR-RFLP. **European Journal of Plant Pathology** 106:225-265. 2000.

PRUVOST, O.; COUTEAU, A.; PERRIER, X. & LUISETTI, J. Phenotypic diversity of *Xanthomonas mangiferaeindicae*. **Journal of Applied Microbiology** 84:115-124. 1998.

ROBBS, C.F. & RODRIGUES NETO, J.. Enfermidades causadas por bactérias em frutíferas tropicais no Brasil. VIDEIRA. Cancro bacteriano dos ramos e bagas ou crestamento das folhas. **Summa Phytopathologica** 25(1):51-52. 1999.

ROBBS, C.F. Algumas bactérias fitopatogênicas do Distrito Federal. **Agronomia** 14:147-164. 1955.

ROBBS, C.F. da PONTE, J.J. & SALES, M. G. Nota sobre *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* no nordeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira** 3(2):215-218. 1978.

ROBBS, C.F., RIBEIRO, R.L.D & KIMURA, O. Sobre a posição taxonômica de *Pseudomonas mangiferaeindicae* Patel *et al.*1948, agente causal da mancha bacteriana das folhas damangueira (*Mangifera indicae* L.). **Arquivos Universidade Federal do Rio de Janeiro** 4:11-14. 1974.

ROBERTS, .D.; JONES, J.B.; CHANDLER, C. K.; STALL, R.E. & BERGER, R. D. Survival of *Xanthomonas fragariae* on strawberry in summer nurseries in Florida detected by specific primers and nested-polymerase chain reaction. **Plant Disease** 80:1283-1288. 1996.

ROGALL, T.; WOLTERS, J. FLOHR, T & BOTTGER, E. Toward a phylogeny and the definition of species at the molecular level within the genus of *Mycobacterium*. **International Journal of Systematic Bacteriology** 40:323-330.1990.

ROZEN, S. & SKALETSKY, H.J. Primer3 for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (Eds). **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology** (1998). Totowa, NJ: Humana Press. 2000. p. 365-386. Disponível em <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>.

SAIKI, R.K.; GELFOND, D.H.; STAEFFEL, S.; SHCARF, S.J.; HIGUCHE, G.; HORN, G.T.; MULLI, K.B. & ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** 239:487-491. 1988.

SAKTHIVEL, N.; MORTENSEN, .N.; MATHUR, S.B. detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in artificially inoculated and naturally infected rice seeds and plants by molecular techniques. **Applied Microbiology and Biotechnology** 56:435-441. 2001.

SAMBROOK J. & RUSSEL D.W. **Molecular Cloning**. A Laboratory Manual. 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 2001.

SANGER, F. NICKLEN, S.; COULSON, R. A. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 74:5463-5467.1977.

SCHAAD, N. W. & STALL, R. E. *Xanthomonas*. In SCHAAD, N.W. (Ed.) Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. St. Paul: The American Phytopathological Society. 2<sup>nd</sup> Ed. 81-84. 1994.

SCHAAD, N. W.; JONES, J.B. & LACY, G. H. *Xanthomonas*. In SCHAAD, N.M. (Ed.) **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. St. Paul: The American Phytopathological Society 175-336. 2000.

SCHAAD, N.W.; CHEONG, S.S.; TAMAKI, S.; HATZILOUKAS, E. & PANOPOULOS, N.J.A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in Bean seed extracts. **Phytopathology** 85(20):243-248. 1995.

SCHAAD, N.W.; OPGENORTH & GAUSH, P. Real-time polymerase chain reaction for onr-hour on-site diagnosis of pierce's disease of grape in early season asymptomatic vines. **Phytopathology** 92:721-728. 2002.

SILVA V.A.V.; AGUIAR, I.F.; CASTRO, G.S>S>; Nascimento, A.R.P.; PAZ, C.D. Ação in vitro de produtos químicos em relação à *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira** 25, 31.2000 (Resumo)

SILVA, A. de S.; PESSOA, A.; CHAIM, A., SILVA, C.M. M.S.; TAMBASCO, F.J.; RRODRIGUES, G.S.; SILVEIRA, L.A.M.; DE SÁ, L.A.N.; HERMES, L.C.; FREIRE, L.C.L.; PESSOA, M.C.P.Y.; LIMA, M, F., HAJI, F.N.P.; LOPES, P.R.C.; FERRACINI, V.L.; VIEIRA, R.F.; GHINI, R. **A região do vale do Rio São Francisco**. Embrapa Meio Ambiente. 2001. Publicação on line. <http://www.cnpma.embrapa.br> Acesso 17/07/2007.

SILVA, P.C.G. da; CORREIA, R.C. Caracterização social e econômica da videira. In: LEÃO, P.C.de S.; SOARES, J.M. **A viticultura no Semi-árido brasileiro**. Petrolina : Embrapa Semi-Árido, 2000. 336p.

SIMÃO, S. Tratado de Fruticultura. Piracicaba. FEALQ. **Fruticultura** I:709-760. 1998.

SONG, W.Y.; KIM, H.M.; HWANG, C.Y. & SCHAAD, N.W. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* in rice seeds using BIO-PCR. **Journal of Phytopathology** 152:667-676. 2004.

STRIPECKE, R. & ROSATO, Y.B. Variabilidade no perfil eletroforético de alfa-esterases e plasmídios em patovares de *Xanthomonas campestris*. **Fitopatologia Brasileira** 13:358-391. 1988.

TAKITA, M.A.; De SOUZA, A.; BORGES, K.M.; COLETA-FILHO,H.D.; NETO RODRIGUES, J. & MACHADO, M.A. A região *rpf* (regulation of pathogenicity factors) distingue espécies de *Xanthomonas*. **Fitopatologia Brasileira** 29:S254. 2004.

TAVARES, S. C. C. de H. **Sistema de Produção, 2. Cultivo da mangueira. Manejo Integrado de doenças**. 2004. Publicação on line. Embrapa Semi-árido. Disponível em:<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira/doencas.htm>. Consultado em 17 de julho de 2007.

TESSMANN, D.J.; DIANESE, J.C.; GENTA, W.; VIDA, J.B.; MAY-DE-MIO, L.L. Grape rust (*Phakopsora euvitis*) first record for Brazil. **Fitopatologia Brasileira** 28:232. 2003.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G. & GIBSON, T.J. CLUSTAW W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choices. **Nucleic Acids Research** 22: 4673-4680. 1994.

TRINDADE, L.C. Caracterização molecular de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, agente causal do cancro bacteriano da videira. **Dissertação de Mestrado**. Brasília, DF. Universidade de Brasília. 2002.

TRINDADE, L.C; LIMA, M.F. & FERREIRA, M.A.S.V. Molecular characterization of Brazilian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira** 30:46-54. 2005.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K. & SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology** 45(5):472-489. 1995.

VERELST, W. & ASAR, H. A phylogenetic study of cytochrome *b561* proteins. **Genome Biology** 4: R38. 2003 (Resumo)

VIVIAN, A.; MURILLO, J. & JACKSON R.W. The roles of plasmids in phytopathogenic bacteria: mobile arsenals? **Microbiology** 147:763-780. 2001.

WANG, Z.K.; COMSTOCK, J.C.; HATZILOUKAS, E. & SCHAAD, N.W. Comparison of PCR, BIO-PCR, DIA, ELISA and isolation on semiselective medium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the agent causal of leaf scald of sugarcane. **Plant Pathology** 48:245-252. 1999.

WEINGART, H. & VOLKSCH, B. Genetic fingerprinting of *Pseudomonas syringae* pathovars using ERIC-, REP-, and IS50-PCR. **Journal of Phytopathology** 145:339-345. 1997.

WILLEMS, A.; GILLIS, M.; KERTERS, K.; VAN DEN BROECHE, L.; DELEY, J. Transfer of *Xanthomonas ampelina* Panagopoulos 1969 to a new genus, *Xylophilus* gen. nov., as *Xylophilus ampelinus* (Panagopoulos 1969) comb. nov.. **International Journal of Systematic Bacteriology** 37: 22-430. 1987.

**ANEXOS**

---

**ANEXO 1**

---

**Tampão fosfato (PBS) 0,1M pH 7,0**Solução A

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	31,2 g
H <sub>2</sub> O	1000 ml

Solução B

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	28,3 g
H <sub>2</sub> O	1000 ml

Esterelizar a solução estoque separadamente a 121°C por 15 min. Para preparar a solução de trabalho adicionar 39 ml da Solução A a 61 ml da solução B e diluir em 200 ml de água.

## ANEXO 2

---

### **Protocolo para detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em tecidos sintomáticos de videiras por BIO-PCR.**

- 1- Coletar amostras de tecidos vegetais de videira: uma folha completa (incluindo o pecíolo) ou haste variando de 2 a 10 cm de comprimento.
- 2- Macerar as amostras completamente em água (sem a necessidade de desinfestação superficial)
- 3- Retirar alíquotas de 50 microlitros e distribuir em meio sólido 523 de Kado & Heskett (1970)
- 4- Lavar as placas após 48 horas do crescimento das colônias a 29 °C com 1ml de água destilada estéril e armazenar em tubo eppendorf de 1,5 ml em freezer.
- 5- Diluir a suspensão bacteriana para 1:10
- 6- Retirar após a diluição 2µl de suspensão para PCR
- 7- Para preparar a PCR utilizar 100 µM de cada dNTPs, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µM de cada iniciador (Xcv1F/Xcv3R), 1X tampão de PCR (20 mM Tris HCl pH 8.4; 50 mM KCl) e 1U de *Taq* polimerase para um volume final de 12 µl.
- 8- Amplificar através de PCR de acordo com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 2 min; 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 64 °C por 1 min e 72 °C por 2 min e um passo de extensão final de 10 min a 72 °C.
- 9- Analisar através de eletroforese em gel de agarose 1 %, por 1 hora a 80 V, corar com brometo de etídeo (0.5 µg/ml). A presença de uma única banda de 240 pb confirmará a presença da bactéria *X. campestris* pv. *viticola* caso o resultado seja positivo.

**ANEXO 3**

---

**Protocolo para detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em tecidos  
assintomáticos de videiras por Nested-BIO-PCR.**

- 1- Coletar amostras de tecidos vegetais de videira: uma folha completa (incluindo o pecíolo) ou haste variando de 2 a 10 cm de comprimento.
- 2- Macerar as amostras completamente em água (sem a necessidade de desinfestação superficial)
- 3- Retirar alíquotas de 50 microlitros e distribuir em meio sólido 523 de Kado & Heskett (1970)
- 4- Lavar as placas após 48 horas do crescimento das colônias a 29 °C com 1 ml de água destilada estéril e armazenar em tubo eppendorf de 1,5ml em freezer.
- 5- Diluir a suspensão bacteriana para 1:10
- 6- Retirar após a diluição 2µl de suspensão para PCR
- 7- Para preparar a PCR utilizar 100 µM de cada dNTPs, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µM de cada iniciador (Xcv1F/Xcv3R), 1X tampão de PCR (20mM Tris HCl pH 8.4; 50mM KCl) e 1U de *Taq* polimerase para um volume final de 12 µl.
- 8- Amplificar através de PCR de acordo com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 2 min; 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 64 °C por 1 min e 72 °C por 2 min e um passo de extensão final de 10 min a 72 °C.
- 9- Diluir 1 µl do produto de PCR de 340 pb amplificado para 1:50.
- 10- Utilizar 2 µl da diluição para 2º ciclo de PCR.

- 11- As reações devem ser preparadas contendo: 100  $\mu$ M de cada dNTPs, 1.5 mM de  $MgCl_2$ , 0.5  $\mu$ M de cada iniciador (Xcv1F/Xcv3R), 1X tampão de PCR (20mM Tris HCl pH 8.4; 50mM KCl) e 1U de *Taq* polimerase para um volume final de 12  $\mu$ l.
- 12- Amplificar por PCR de acordo com as condições descritas no item 8.
- 13- Analisar através de eletroforese em gel de agarose 1 %, por 1 hora a 80 V, e corar com brometo de etídeo (0.5  $\mu$ g/ml). A presença de uma única banda de 240 pb confirmará a presença da bactéria *X. campestris* pv. *viticola* caso o resultado seja positivo.

## ANEXO 4

**Comparação das sequências parciais de *X. campestris* pv. *viticola* e *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* com sequências disponíveis no GenBank através do Blast.**

Estirpes bacterianas	Região ITS		
	Espécie no GenBank	Nº de acesso no GenBank	Identidade
<sup>a</sup> NCPPB 2475	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> estirpe LW	AF 442744.1	98%
<sup>b</sup> UnB 1183	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> estirpe LW	AF 442744.1	94%
<sup>c</sup> IBSBF 1386	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> estirpe XCW	DQ991181	99%
IBSBF 1369	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	AY613946.1	95%
	<i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> estirpe 16	AF279434.1	93%
UnB 1205	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> estirpe LW	AF 442744.1	98%
	<i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> estirpe 16	AF279434.1	98%
UnB 769	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> estirpe LW	AF 442744.1	91%
UnB 764	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> estirpe XCW	DQ991181	99%
IBSBF 1230	<i>X. citri</i> estirpe FB 1314	DQ 660898	91%
IBSBF 1508	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	DQ 414745	99%
	<i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> estirpe 16	AF 279434	94%
<sup>d</sup> CCP-76	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	DQ 414745	94%

Estirpes bacterianas	Região 16S rRNA		
	Espécie no GenBank	Nº de acesso no GenBank	Identidade
<sup>a</sup> NCPPB 2475	- <i>X. citri</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> estirpe CFBP1716	EF 989732	99%
<sup>b</sup> UnB 1183	- <i>X. citri</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> estirpe CFBP1716	EF 989732	96%
	<i>X. campestris</i> estirpe R57.5	EF101985.1	96%
<sup>c</sup> IBSBF 1386	<i>X. citri</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> estirpe CFBP1716	EF 989732	96%
IBSBF 1369	<i>X. citri</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> estirpe CFBP1716	EF 989732	92%
UnB 1205	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	AF000946	95%
	<i>X. citri</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i>	EF989732	95%
	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> estirpe XCW	DQ991194	91%
UnB 769	<i>X. citri</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> estirpe CFBP1716	EF 989732	94%
	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> estirpe XCW N° de acesso identidade	DQ991194	94%

UnB 764	<i>X. citri</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> estirpe CFBP1716	EF 989732	97%
	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> estirpe XCW	DQ991194	97%
IBSBF 1230	<i>X. citri</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> estirpe CFBP1716	EF 989732	96%
	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> estirpe XCW	DQ991194	96%
	<i>X. campestris</i> pv. <i>cariandri</i>	AYE04178	96%
IBSBF 1508	<i>X. citri</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> estirpe CFBP1716	EF 989732	95%
	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> estirpe XCW	DQ991194	95%
<sup>d</sup> CCP-76	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> estirpe XCW	DQ991194	95%
	<i>X. citri</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> estirpe CFBP1716	EF 989732	91%

Estirpes bacterianas	Região do gene citocromo <i>b561</i> -like		
	Espécie no GenBank	Nº de acesso no GenBank	Identidade
<sup>a</sup> NCPPB 2475		<b>ND</b>	
<sup>b</sup> UnB 1183		ND	
<sup>c</sup> IBSBF 1386		ND	
IBSBF 1369	<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	AM 039952	86%
UnB 1205		ND	
UnB 769		<b>ND</b>	
UnB 764		ND	
IBSBF 1230	<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	AM 039952-	93%
IBSBF 1508	<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	AM 039952-	94%
<sup>d</sup> CCP-76		ND	

**ND- não determinado**

Estirpes bacterianas	Região do gene <i>hrpB6</i>		
	Espécie no GenBank	Nº de acesso no GenBank	Identidade
<sup>a</sup> NCPPB 2475	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> estirpe 8rahrp	AF499777	97%
<sup>b</sup> UnB 1183	<i>X. campestris</i> gene <i>hrpB6</i>	M99174	96%
<sup>c</sup> IBSBF 1386	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> estirpe 8rahrp	AF499777	99%
	<i>X. campestris</i> gene <i>hrpB6</i>	M99174	92%
IBSBF 1369	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> estirpe 8rahrp	AF499777	99%
UnB 1205	<i>X. campestris</i> gene <i>hrpB6</i>	M99174	92%
UnB 769	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> estirpe 8rahrp	AF499777	99%
	<i>X. campestris</i> gene <i>hrpB6</i>	M99174	94%
UnB 764	<i>X. campestris</i> gene <i>hrpB6</i>	M99174	93%

	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> estirpe 8rahrp	AF499777	91%
IBSBF 1230	<i>X. campestris</i> gene <i>hrpB6</i>	M99174	93%
IBSBF 1508	<i>X. campestris</i> gene <i>hrpB6</i>	M99174	93%
	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> estirpe 8rahrp	AF499777	91%
<sup>d</sup> CCP-76	<i>X. campestris</i> gene <i>hrpB6</i>	M99174	93%
	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> estirpe 8rahrp	AF499777	93%

**ANEXO 5**

---

TRINDADE, L.C.; MARQUES, E.; LOPES, D.B.; FERREIRA, M.A.S.V. Development of a molecular method for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Summa Phytopathologica** 33:16-23. 2007.

## ERRATA

A Tabela 1 do artigo “Trindade, L.C.; Marques, E.; Lopes, D.B.; Ferreira, M.A.S.V. Development of a molecular method for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Summa Phytopathologica** 33:16-23.2007” continha erros de correção. A Tabela corrigida encontra-se abaixo.

**Tabela 2.** Estirpes bacterianas utilizadas neste estudo.

Espécies	Número de estirpes	Hospedeiro de origem
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i>	44	<i>Vitis vinifera</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	01	<i>Daucus carota</i>
<i>Bacillus thuringiensis</i>	01	-
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	02	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	01	<i>Beta vulgaris</i>
<i>Pseudomonas cichorii</i>	01	<i>Lactuca sativa</i>
<i>Pseudomonas corrugata</i>	01	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>Burkholderia caryophylli</i>	01	<i>Dianthus caryophyllus</i>
<i>Ralstonia solanacearum</i>	01	<i>Solanum tuberosum</i>
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	04	<i>Glycine max</i>
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	01	<i>Gossypium hirsutum</i>
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	07	<i>Manihot esculenta</i>
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>	06	<i>Passiflora</i> sp.
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	03	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>ricini</i>	02	<i>Ricinus communis</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>arracaciae</i>	01	<i>Arracacia xanthorrhiza</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	05	<i>Brassica oleraceae</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>carotae</i>	01	<i>Daucus carota</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i>	01	<i>Anacardium occidentale</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i>	03	<i>Mangifera indica</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	03	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	03	<i>Capsicum</i> spp.
<i>X. campestris</i> pv. <i>vitians</i>	01	<i>Lactuca sativa</i>
<i>X. melonis</i>	01	<i>Cucumis sativus</i>
Bactérias epifíticas e/ou endofíticas	20	<i>Vitis vinifera</i>

# ARTIGOS

## Development of a molecular method for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*

Loiselene Carvalho da Trindade<sup>1</sup>, Eder Marques<sup>1</sup>, Daniela Biaggioni Lopes<sup>2</sup>, Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, CEP 70910-900, Brasília, DF, e-mail: marisavf@unb.br; <sup>2</sup>EMBRAPA-Semi Árido, C.P. 23, CEP 56300-970, Petrolina, PE.  
Autora para correspondência: Marisa A. S. Velloso Ferreira  
Data de chegada: 14/03/2005. Aceito para publicação em: 04/05/2006.

1182

### ABSTRACT

Trindade, L.C.; Marques, E.; Lopes, D.B.; Ferreira, M.A.S.V. Development of a molecular method for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Summa Phytopathologica*, v.33, n.1, p.16-23, 2007.

In order to develop a molecular method for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (*Xcv*) the causal agent of grapevine bacterial canker, primers were designed based on the partial sequence of the *hrpB* gene. Primer pairs Xcv1F/Xcv3R and RST2/Xcv3R, which amplified 243- and 340-bp fragments, respectively, were tested for specificity and sensitivity in detecting DNA from *Xcv*. Amplification was positive with DNA from 44 *Xcv* strains and with DNA from four strains of *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* and five strains of *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, with both primer pairs. However, the enzymatic digestion of PCR products could differentiate *Xcv* strains from the others. None of the primer pairs amplified DNA from grapevine, from 20 strains of nonpathogenic bacteria from grape leaves and 10

strains from six representative genera of plant pathogenic bacteria. Sensitivity of primers Xcv1F/Xcv3R and RST2/Xcv3R was 10 pg and 1 pg of purified *Xcv* DNA, respectively. Detection limit of primers RST2/Xcv3R was 10<sup>4</sup> CFU/ml, but this limit could be lowered to 10<sup>2</sup> CFU/ml with a second round of amplification using the internal primer Xcv1F. Presence of *Xcv* in tissues of grapevine petioles previously inoculated with *Xcv* could not be detected by PCR using macerated extract added directly in the reaction. However, amplification was positive with the introduction of an agar plating step prior to PCR. *Xcv* could be detected in 1 µl of the plate wash and from a cell suspension obtained from a single colony. Bacterium identity was confirmed by RFLP analysis of the RST2/Xcv3R amplification products digested with *Hae* III.

Additional key words: PCR, grapevines, *Vitis vinifera*, bacterial canker

### RESUMO

Trindade, L.C.; Marques, E.; Lopes, D.B.; Ferreira, M.A.S.V. Desenvolvimento de um método molecular para detecção e identificação de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Summa Phytopathologica*, v.33, n.1, p.16-23, 2007.

Com o objetivo de desenvolver um método molecular para detecção e identificação de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (*Xcv*), agente causal do cancro bacteriano da videira, oligonucleotídeos (*primers*) foram desenhados com base na sequência parcial do gene *hrpB*. As combinações de *primers* Xcv1F/Xcv3R e RST2/Xcv3R que amplificaram fragmentos de 243 e 340 pb, respectivamente, foram testadas quanto à especificidade e sensibilidade para detecção do DNA de *Xcv*. Com os dois pares de *primers*, amplificação foi positiva com o DNA de 44 isolados de *Xcv*, mas também com quatro isolados de *X.c.* pv. *mangiferaeindicae* e cinco de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. Contudo, a digestão dos produtos de PCR permitiu diferenciar *Xcv* dos isolados desses patógenos. Nenhum dos dois pares de *primers* amplificou o DNA de videira, nem de 20 bactérias não patogênicas isoladas da flora

da videira, ou de 10 isolados de outros seis gêneros de bactérias fitopatogênicas. A sensibilidade dos *primers* Xcv1F/Xcv3R e RST2/Xcv3R foi de 10 pg e 1 pg de DNA purificado de *Xcv*, respectivamente. O limite de detecção de RST2/Xcv3R foi de 10<sup>4</sup> UFC/ml, mas empregando-se uma segunda rodada de amplificação com o *primer* interno Xcv1F, esse limite foi de 10<sup>2</sup> UFC/ml. Não foi possível detectar por PCR a presença de *Xcv* usando-se, diretamente na reação, o extrato do macerado de pecíolos de videira previamente inoculados. Entretanto, ampliações foram positivas quando se utilizou uma etapa de enriquecimento em meio de cultura antes da PCR. Detectou-se *Xcv* em 1 µl da suspensão obtida do lavado das placas e em uma suspensão obtida a partir de uma única colônia. A identidade da bactéria foi confirmada pela análise de RFLP dos produtos de amplificação dos *primers* RST2/Xcv3R com *Hae*III.

Palavras-chave adicionais: PCR, videira, *Vitis vinifera*, cancro bacteriano

*Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye (21) is the causal agent of grapevine canker disease, an important bacterial disease of grapevines in northeastern Brazil. This pathogen was first reported in the irrigated areas of the São Francisco river basin in Petrolina, state of Pernambuco (18). Later, the disease was also detected in Juazeiro, state of Bahia, and in the states of Piauí (17) and Ceará (8). *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* is a gram-negative, non-pigmented bacterium which presents the following characteristics: aerobic metabolism, does not produce urease and oxidase but produces catalase, does not utilize asparagine as the sole source of C and N, tolerates up to 2% NaCl, and produces acid from glucose, mannose, galactose, trehalose, cellobiose and fructose (6,14,18,21). The disease is characterized by necrotic leaf spots, which sometimes coalesce, producing extensive necrosis. Symptoms also develop on leaf veins, petioles, pedicels and rachis of grape clusters. Cankers and vascular discoloration are usually observed on stems (14,18,21). Integrated management of bacterial canker can be achieved by the use of healthy propagative material, routine field inspections, drastic pruning of infected plants, roguing, management of production periods, disinfestation of vehicles, equipments and pruning tools, the use of copper and thiocarbamats as protecting fungicides, the use of windbreaks and localized irrigation to reduce bacterial dissemination (14,20).

Diagnosis of grapevine bacterial canker is based on symptoms developed on leaves, grape clusters and stems, followed by bacterial isolation and identification using biochemical and nutritional tests. Identification at the pathovar level depends on pathogenicity tests on grapevine susceptible varieties, with a period of 7-12 days for development of the first symptoms (14,18). Detecting and identifying *X. c.* pv. *viticola* in grapevine plant parts and/or propagative material, either symptomatic or asymptomatic, can be a time-consuming task with the currently available methods. Serological and molecular methods are more sensitive and specific and can improve the diagnosis of bacterial diseases. Polyclonal antibodies have already been developed for *X. c.* pv. *viticola* (3), and despite showing weak cross-reaction with *X. c.* pv. *campestris*, *X. c.* pv. *vesicatoria* and *X. c.* pv. *mangiferaeindicae*, they can potentially be used in serological tests for specific identification of *X. c.* pv. *viticola*.

Polymerase chain reaction (PCR) has been widely used and shown to have multiple applications in plant disease diagnosis, including several bacterial diseases (9,11,16,22,23). PCR-based detection methods offers several advantages such as high sensitivity to detect small amounts of DNA in infected or asymptomatic materials, without requiring organism culturing (19).

In plant pathogenic bacteria, several genomic regions have been explored in order to design primers for PCR-based detection, such as the ribosomal DNA spacer regions and the *hrp* gene cluster (16). The *hrp* genes have been discovered and characterized in several bacterial plant pathogens and they play a role in both hypersensitivity reaction and pathogenicity (15). *Hrp* genes are highly conserved in the genus *Xanthomonas* and they can be used to differentiate *Xanthomonas* strains both at pathovar and species levels. Leite Jr. *et al.* (12,13) designed specific primers based on the corresponding region of the *hrpB* gene for the detection and identification of *X. campestris* pv. *vesicatoria* by PCR. Roberts *et al.* (23) also demonstrated that the amplification and sequencing of a *hrp*-gene region allowed the selection of highly specific primers with high sensitivity for detecting *X. fragariae* in both symptomatic and asymptomatic strawberry plants. Specific primers based on *hrp* sequences are particularly useful for detection of

pathogenic xanthomonads, since nonpathogenic strains lack these genes (12).

*Xanthomonas campestris* pv. *viticola* is considered a pathogen of quarantine importance. The use of pathogen-free propagative material has become an important concern, considering the very restricted occurrence of this pathogen in the country and the risk of its establishment in other grapevine producing regions in south and southeast Brazil. Thus, the development of rapid and reliable procedures for detecting and identifying this pathogen is an important step for disease management in the affected areas, as well as for preventing its spread to other regions in the country. The objective of this work was to develop primers and to evaluate their potential for detection and identification of *X. c.* pv. *viticola* by PCR.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial strains: origin and maintenance

Forty-one *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* strains collected in grapevine producing areas in the "Submédio" of the São Francisco river valley, states of Pernambuco and Bahia, were used in this study. The strains were collected from 1998- 2003, from various grapevine cultivars. Two strains collected in Teresina, Piauí, and the reference strain of this bacterium (NCPPB 2475) were also included. Forty-two strains of *Xanthomonas* isolated from various host plants, as well as 10 strains belonging to six other genera of phytopathogenic bacteria, and 20 strains of epiphytic and/or endophytic bacteria isolated from grape leaves, were included to determine primer specificity (Table 1). All strains were cultivated on Kado's 523 medium (10). For long-term storage, strains were kept on sterile distilled water at room temperature and frozen in 30% glycerol at -80 °C.

### DNA Extraction

DNA was extracted from grape leaves according to the protocol described by Doyle & Doyle (7). Bacterial DNA was extracted using a modified version of the CTAB method from Ausubel *et al.* (4). Single colonies grown on Kado's 523 medium were transferred to 1.5 ml of liquid 523 medium and cultures were grown on a shaker for 48 h at 28 °C. After this period, cultures were centrifuged at 4600x g for 5 min. The resulting pellets were resuspended in 520 µl of TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0). Fifteen microliters of 20% SDS and 3 µl of Proteinase K (20 mg/ml) were added. The mixture was incubated for 1 hour at 37°C, then 100 µl of 5 M NaCl and 80 µl of a 10% CTAB solution in 0.7 M NaCl were added and mixed. The suspension was incubated for 10 min at 65°C and kept on ice for 15 min. An equal volume of chloroform: isoamyl alcohol (24:1) was added, followed by incubation on ice for 5 min and centrifugation at 7200 x g for 20 min. The aqueous phase was transferred to a new tube, isopropanol (1: 0.6) was added and DNA was precipitated at -20 °C for 16 h. DNA was collected by centrifugation at 7200 x g for 10 min, washed with 500 µl of 70% ethanol, air-dried at room temperature for approximately three hours and finally dissolved in 50 µl of TE buffer. DNA was quantified on 0.8% agarose gels by comparison with DNA samples (phage λ DNA-*Hind* III fragments) of known concentration, diluted to working aliquots of 50 ng/µl and stored at -20 °C.

### Amplification and sequencing of a *hrpB* region of *X. c.* pv. *viticola*

Primers RST2 and RST3 (12) were used to amplify a 840-bp

**Table 1.** Bacterial strains used in this study.

Organism	Number of isolates	Host
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i>	44	<i>Vitis vinifera</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	01	<i>Daucus carota</i>
<i>Bacillus thuringiensis</i>	01	-
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	02	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	01	<i>Beta vulgaris</i>
<i>Pseudomonas cichorii</i>	01	<i>Lactuca sativa</i>
<i>Pseudomonas corrugata</i>	01	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>Ralstonia solanacearum</i>	02	<i>Dianthus caryophyllus</i>
<i>Ralstonia solanacearum</i>	01	<i>Solanum tuberosum</i>
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	04	<i>Glycine max</i>
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	01	<i>Hibiscus</i> sp.
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	07	<i>Manihotis esculenta</i>
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>	06	<i>Passiflora</i> sp.
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	03	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>ricini</i>	02	<i>Ricinus communis</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>arracaciae</i>	01	<i>Arracacia xanthorrhiza</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	05	<i>Brassica oleraceae</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>carotae</i>	01	<i>Daucus carota</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i>	01	<i>Anacardium occidentale</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i>	03	<i>Mangifera indica</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	03	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	03	<i>Capsicum</i> spp.
<i>X. campestris</i> pv. <i>vitians</i>	01	<i>Lactuca sativa</i>
<i>X. melonis</i>	01	<i>Cucumis sativus</i>
Epiphytic and/or endophytic bacteria	20	<i>Vitis vinifera</i>

fragment of the *hrpB* gene from genomic DNA of *X.c.* pv. *viticola* (NCPBP 2475), *X.c.* pv. *mangiferaeindicae* (UnB 764) and *X. axonopodis* pv. *manihotis* (UnB 1111). Each PCR mixture contained: 0.5  $\mu$ M of each primer; 200  $\mu$ M dNTPs; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1X PCR buffer (20 mM TrisHCl pH 8.4; 50 mM KCl); 1.25 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Life Technologies) and 50 ng template DNA in a final volume of 25  $\mu$ l. PCR was conducted in a PT-100 thermocycler (MJ Research, Watertown, Mass) using an initial denaturation at 95° C for 2 min, followed by 30 cycles of 95° C for 1 min, 62° C for 1 min, 72° C for 1 min, and an additional extension step at 72° C for 5 min. Specific PCR products from the three representative strains were quantified and adjusted to a final concentration of 70 ng/ $\mu$ l. After ethanol precipitation, purified PCR products were sequenced using the dideoxy chain-termination procedure (26) with fluorescent dyes (Dynamic ET terminator Cycle Sequencing Kit, Amersham Biosciences). In each sequencing reaction generating a single-strand template, total volume reaction of 10  $\mu$ l comprised 4  $\mu$ l of sequencing reagent premix, 2  $\mu$ l primer (10  $\mu$ M), 1  $\mu$ l PCR product (100 ng) and 3  $\mu$ l sterile water. Sequence reactions were carried out on a Gene Amp PCR System 9700 thermocycler (Applied Biosystems, USA) using 30 cycles of 95° C for 20 s, 50° C for 15 s, and 60° C for 1 min. Each product was purified via a standard ethanol precipitation protocol and dissolved in 10  $\mu$ l of Dyanamic ET loading solution (Pharmacia Biotech, USA) for 60 min. Automated sequencing was conducted using a MegaBace 1.000 – DNA Analyzer System (Pharmacia Biotech,

USA) with an injection voltage of 3 KV, an injection time of 60 s, and a running voltage of 9 V. Sequences were verified via BLASTN (1), and alignment conducted using the program Clustal W (29).

#### Primer design and selection

Potential primers were identified using program PRIMER 3 (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, Mass.) (24). Three primers were designed and tested in five possible combinations with external primers RST2 and RST3. Primers were synthesized commercially by Invitrogen Brasil (Life Technologies, São Paulo, Brazil). The following criteria were used to choose the best primer pair combination: absence of secondary bands, reproducibility, and positive amplification with all *X.c.* pv. *viticola* strains tested.

#### Primer specificity

Two out of five possible primer pair combinations (*Xcv1F/Xcv3R* and *RST2/Xcv3*) were screened for specificity to *X.c.* pv. *viticola* in 12  $\mu$ l- reaction mixtures containing 10 ng of template DNA, 100  $\mu$ M each dNTPs, 1.5 mM Mg Cl<sub>2</sub>, 0.5  $\mu$ M of each primer, 1X PCR buffer (20 mM TrisHCl pH 8.4; 50 mM KCl) and 1 U *Taq* DNA polymerase. All tests were performed in a PT 100 thermocycler (MJ Research, Watertown, Mass) with an initial denaturation step at 95° C for 2 min; 30 cycles of 95° C for 1 min, 64° C for 1 min and 72° C for 2 min, and a final extension step of 10 min at 72° C. PCR products were analyzed by loading the total reaction volume on 1% agarose gels and staining

with ethidium bromide (0.5 µg/ml).

### PCR-RFLP

PCR products from *Xanthomonas* were digested with endonuclease *Hae* III (Pharmacia Biotech). Digestions were performed as follows: 6 µl PCR product; 1 µl 10X enzyme buffer and 2U of enzyme in a final volume of 10 µl, at 37°C for 16 h. Restriction fragments were separated by electrophoresis in 2.5% agarose gels or in 21% polyacrylamide gels and visualized after staining with ethidium bromide.

### Primer sensitivity

The limit of detection of the *X.c. pv. viticola* specific fragment was determined by using a 10-fold serial dilutions of purified genomic DNA of strains NCPPB 2475 and UnB 1183, and a 10<sup>9</sup> CFU/ml suspension culture from strain NCPPB 2475. Aliquots of 2 µl and 0.05 ml were used for PCR amplification and colony counts on 523 medium, respectively.

### Detecting *X.c. pv. viticola* in symptomatic plant tissue

Grapevine plants (cv. Perlette) were inoculated by pricking the petiole surface with a sterile needle charged with a 2-day-old culture of strain UnB1186. Three petioles were inoculated per plant and they were covered with plastic bags for 48 h after inoculation to maintain high humidity. Plants were kept under a shaded greenhouse and observed daily for symptom development. After 41 days, fragments of petioles were collected and used for PCR detection with primer pair RST2/Xcv3R. The presence of *X.c. pv. viticola* in inoculated petioles, was investigated using three different methods as follow: (1) direct detection by macerating plant tissue in 500 µl water and using 1 µl for PCR amplification; (2) using a modified BIO-PCR protocol (27), in which aliquots of macerated tissue extracts were plated on 523 medium and after 72 h the surface of the medium was washed with 1 ml of sterile water, and 1 µl of the plate wash was used for PCR, and (3) macerated tissue extracts were plated on 523 medium, after 72 h one single suspect colony was collected in 200 µl of water and 1 µl was used for PCR.

## RESULTS AND DISCUSSION

The amplification of a *hrpB*-gene region from *X.c. pv. viticola* and other xanthomonads was reproducible and produced an amplicon of approximately 840 bp for all strains tested. PCR products were partially sequenced and three primers were designed (Figure 1). These primers were tested in five combinations with previously designed primers RST2 and RST3 (12): (1) RST2/Xcv3R; (2) RST2/Xcv2R; (3) Xcv1F/Xcv3R; (4) Xcv1F/Xcv2R, and (5) Xcv1F/RST3. Combinations (2) and (4) did not yield any amplified product, while combination (5) produced a fragment of expected size (~700 bp), but also several nonspecific secondary bands. Primer combinations (1) and (3) gave the expected amplicons of 340 and ~240 bp, respectively, with DNA from *X.c. pv. viticola* (Figure 1). Therefore, these two latter sets of primers were selected and tested for specificity.

Amplification was positive for all 44 *X.c. pv. viticola* strains tested with these two sets of primers, RST2/Xcv3R and Xcv1F/Xcv3R. However, amplification was also positive with DNA from four *X.c. pv. mangiferaeindicae* strains and from five strains of *X. a. pv. passiflorae*, as detected on ethidium-bromide stained agarose gels (Figure 2). Specificity of both primer pairs were also tested with genomic DNA from strains of other six genera of phytopathogenic

bacteria, grape leaves and a total of 20 epiphytic and/or endophytic bacteria isolated from grape leaves, and no detectable product was observed (Figure 2).

A differentiation of the strains of *X.c. pv. viticola* from the strains of *X.c. pv. mangiferaeindicae* and *X.a. pv. passiflorae* was performed with an additional restriction digestion step of the PCR products. Polymorphism was detected among the strains belonging to the three pathovars. *Hae*III digestion of RST2/Xcv3R-amplified products generated distinct banding patterns for each pathovar. Strains of *X.c. pv. viticola* yielded 5 bands with approximately 100, 70, 60, 55 and 25 bp, while strains of *X.c. pv. mangiferaeindicae* showed two distinct restriction profiles and *X.a. pv. passiflorae* strains showed only one profile, with 3 fragments of approximately 250, 65 and 45 bp (Figure 3).

Although they can be considered semi-specific since amplification was also positive with *X.c. pv. mangiferaeindicae* and *X.a. pv. passiflorae*, it is unlikely that strains of these pathogens would be found infecting grapevines under field conditions. Moreover, the size of the amplified RST2/Xcv3R product is suitable for restriction digestion and visualization in agarose gels, if additional confirmation is required. All *X.c. pv. viticola* tested strains produced the same restriction profile, distinct from the other two pathovars. Taxonomic and phylogenetic relationships among *X.c. pv. viticola* and these two pathovars have not been investigated. Interestingly, pathovars *viticola* and *mangiferaeindicae* share many similarities: they were both first described in India, some strains are not yellow pigmented and they have similar disease cycles and epidemiology. Their relationship should be more carefully studied.

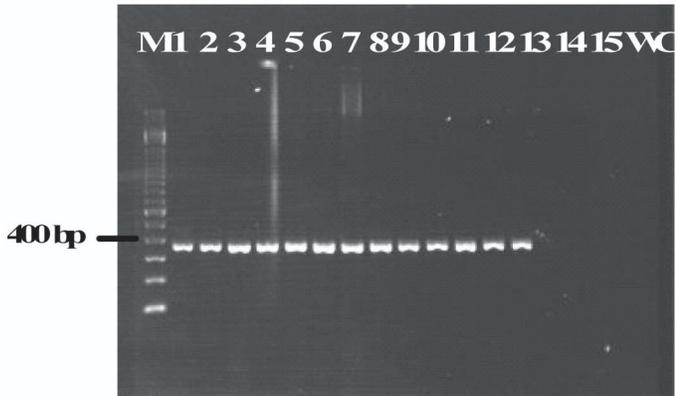
The detection limit for primer pair Xcv1F/Xcv3R was 10 pg of purified DNA. Primer pair RST2/Xcv3R was more sensitive, and allowed the detection of 1 pg of bacterial DNA per reaction (Figure 4A). The same level of sensitivity was reported for a PCR assay developed for *Erwinia amylovora* (5), and for *Xanthomonas albilineans* (22), but for *X. oryzae pv. oryzae*, a visible band was detected with as low as 55 fg of purified DNA (25). When serial dilutions of bacterial cell suspensions were used directly in the reaction (from 10<sup>9</sup> to 10 CFU/ml) a detectable product was visible up to 10<sup>4</sup> CFU/ml (Figure 4B), which corresponded roughly to 20 cells per reaction tube. A 1:50 dilution of the PCR products obtained with primers RST2/Xcv3R was used in a second round of amplification with the internal primer Xcv1F and primer Xcv3R. This nested-PCR approach increased sensitivity 100-fold, and as low as 10<sup>2</sup> UFC/ml could be detected (Figure 4C). This corresponded roughly to less than one cell in the reaction. Levels of sensitivity as high as 1 CFU or less per reaction have been reported (16). High primer sensitivity is important for direct detection in plant tissue and for detecting bacteria in latent infections when pathogen population is low (below 10<sup>5</sup> CFU/ml) (5).

When primers RST2 and Xcv3R were used to detect *X.c. pv. viticola* in artificially inoculated petioles, amplification was positive only when an additional growth step was included. The bacterium could not be detected when suspensions were prepared from macerated tissue and used directly in the reaction mixture, probably due to the presence of PCR inhibitors. Lower sensitivity and inhibitors problems can be circumvented with the addition of an enrichment step, such as BIO-PCR, which has the advantage that only viable cells multiply and give a positive amplification signal (27). Moreover, sensitivity of BIO-PCR assays is extremely high, detecting as few as 1-2 CFU/ml (28).

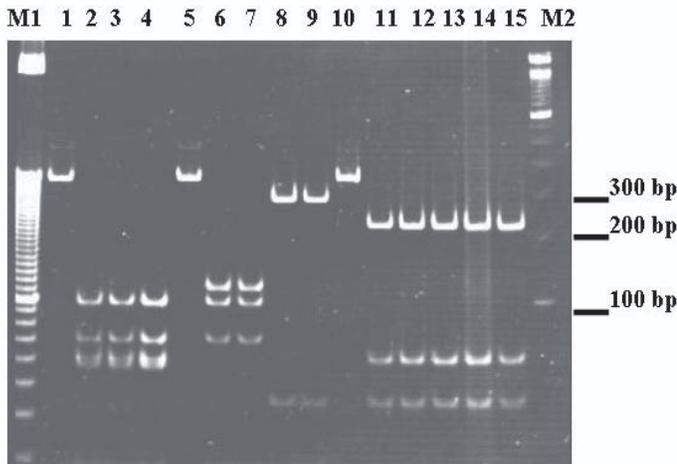
In this study, an enrichment step was employed but bacterial



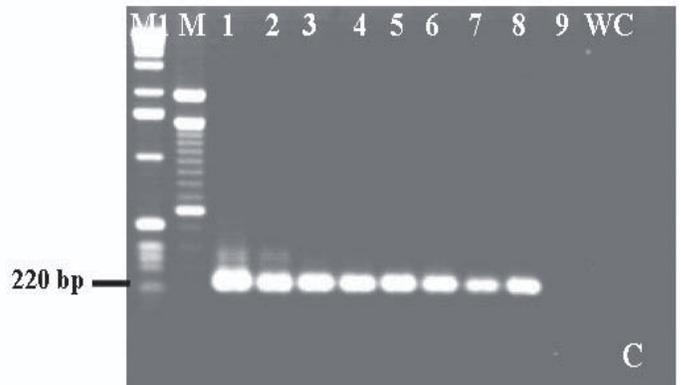
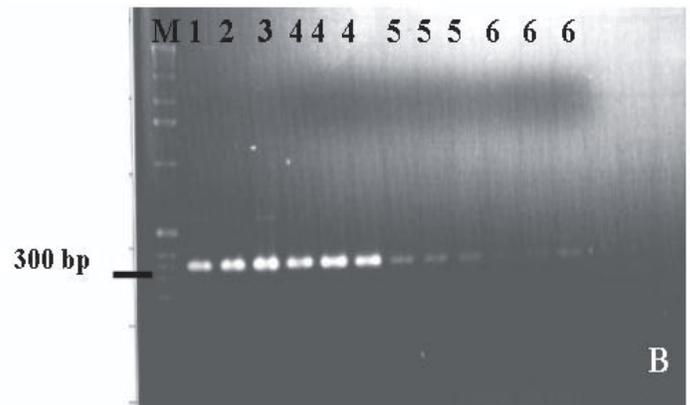
**Figure 1.** Partial sequence alignment of the *hrpB* gene amplified with primers RST2 and RST3 from *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (NCPPB 2475), *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (UnB 764) and *X. axonopodis* pv. *manihotis* (UnB 1111). Nucleotide identity is indicated by \*; (—) alignment gaps and deletions; underlined and bold sequences indicate the three primers designed and synthesized in this study.



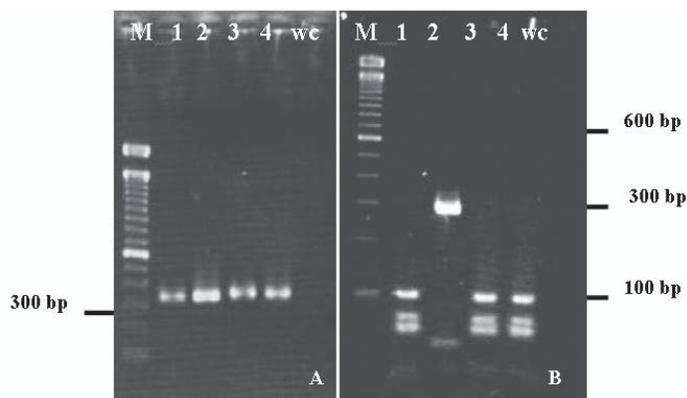
**Figure 2.** PCR amplification with primer pair RST2/Xcv3R, visualized on a 1% agarose gel. M - 100 bp-ladder (GIBCO/BRL); lanes (1)- NCPPB 2475; (2) - UnB - 1186; (3)- UnB 1187; (4)- IBSBF 1369; (5)- UnB 682; (6)- UnB 675; (7)- UnB 674; (8)- UnB 684; (9) - UnB 676; (10)- UnB 764; (11)- UnB 769; (12)- IBSBF 1230; (13)- IBSBF 1508; (14)- DNA from grape leaves; (15)- *Ralstonia solanacearum* and WC- negative water control. Lanes 1 – 4: *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*; Lanes 5- 9: *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, lanes 10-13: *X.c.* pv. *mangiferaeindicae*.



**Figure 3.** *HaeIII*- restriction digestion of PCR products amplified with primers RST2/Xcv3R separated on 21% polyacrylamide gel. M1: 10 bp-ladder; M2: 100 bp ladder; lanes (1)-NCPPB 2475 – undigested product; (2)-NCPPB 2475; (3)- UnB 1186; (4)- UnB 1187; (5)- UnB 764 – undigested product; (6)- UnB 764; (7)- UnB 769; (8)- IBSBF 1230; (9)- IBSBF1508; (10)- UnB 682 – undigested; (11)- UnB 682; (12)- UnB 675; (13)- UnB 674; (14)- UnB 684; (15) - UnB 676. Lanes 1 – 4: *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*; lanes 5- 9: *X.c.* pv. *mangiferaeindicae*; lanes 10-15: *X. axonopodis* pv. *passiflorae*.



**Figure 4-** Detection limit of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* DNA amplified with primers RST2/Xcv3R. (A)- Dilution series of DNA from strain NCPPB 2475. M-100 bp ladder; Lane 1- 10 ng; 2- 1 ng; 3- 0,01 ng; 4- 0,001 ng; 5- 0,0001 ng; 6- 0,00005 ng; WC – water control. (B)- Dilution series of a cell suspension of strain NCPPB 2475. Lane 1-  $10^9$  CFU/ml; 2-  $10^8$  CFU/ml; 3-  $10^7$  CFU/ml; 4-  $10^6$  CFU/ml; 5-  $10^5$  CFU/ml; 6-  $10^4$  CFU/ml.(C)- Nested-PCR with primers Xcv1F/Xcv3R. PCR products obtained with primers RST2/ Xcv3R (Fig. 4B) were diluted (1:50) and used as templates. M1- 1 Kb ladder; M- 100 bp ladder; lane 1-  $10^9$  CFU/ml; 2-  $10^8$  CFU/ml; 3 -  $10^7$  CFU/ml; 4-  $10^6$  CFU/ml; 5-  $10^5$  CFU/ml, 6-  $10^4$  CFU/ml, 7-  $10^3$  CFU/ml, 8-  $10^2$  CFU/ml, 9- 10 CFU/ml; WC- water control.



**Figure 5.** PCR-detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (*Xcv*) in inoculated and symptomatic grapevine petioles. **(A)** PCR with primers RST2/ Xcv3R: M- 100 bp DNA ladder; lane 1- *Xcv* UnB 1186 (purified DNA); lane 2- *X.c. pv. mangiferaeindicae* IBSBF 1230 (purified DNA); lane 3- agar plate-washings from macerated tissue after 72 h incubation; lane 4 - one single colony of *Xcv* grown after 72 h; and wc- water control. **(B)**- *Hae*III- restriction digestion of PCR products amplified with primers RST2/Xcv3R separated on a 2,5% agarose gel. Same samples as in 5A.

colonies were only recovered from symptomatic petioles. No bacterial colonies were recovered from uninoculated petioles or from inoculated asymptomatic petioles, thus PCR could not be performed with samples from asymptomatic tissue. PCR was tested with aliquots of the plate wash obtained from symptomatic tissue and using a cell suspension from a single suspect colony. In both cases amplifications were positive (Figure 5A). Bacterium identity was confirmed by *Hae*III digestion of PCR products, which produced the typical *X.c. pv. viticola* restriction profile (Figure 5B) and by observation of some cultural and biochemical characteristics of the colonies. Lack of yellow pigmentation, a positive reaction in the potassium hydroxide (3% KOH) solubility test, and lack of growth on asparagin medium were all in accordance with the PCR-based identification assay.

Total time required for *X.c. pv. viticola* PCR-based detection and identification was 3 to 4 days, which was an advantage of the method when compared to the conventional techniques (at least 10 days for isolation, culturing, and identification by traditional bacteriological and pathogenicity tests). Although PCR has proven to be a very useful method for disease diagnosis and detection of various pathogens, potential problems such as contamination, false negatives and higher cost compared to serological detection, must be considered before adapting protocols for routine or large-scale testing (19).

Plant pathogenic bacteria, represented by diverse populations in the environment, often require complementary and multiple tests for identification (2). A PCR- detection and identification method could be very useful as an additional tool for monitoring *X.c. pv. viticola*-contaminated plant material. In this study, primers targeted to a pathogenicity gene were shown to specifically amplify DNA from *X.c. pv. viticola* and did not amplify host plant DNA or bacterial DNA from grapevine microflora. Our results showed that PCR could be used to detect and identify the pathogen in symptomatic plant tissue. Evaluation of PCR to detect *X.c. pv. viticola* in different plant parts as well as in asymptomatic grapevines will be the subject of future studies.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by CNPq (Proc. 475111/2003-6),

which also provided scholarships to E. Marques and L.C. Trindade.

#### REFERENCES

- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Meyers, E.W.; Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, p. 403-410, 1990.
- Alvarez, A.M. Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.42, p. 339-366, 2004.
- Araújo, J.S.P.; Reis Júnior, F.B.; Cruz, G.B.; Oliveira, B.C.; Robbs, C.F.; Ribeiro, R.L.D.; Polidoro, J.C. Produção e caracterização de anticorpos policlonais contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.3, p.305-309, 2005.
- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. (Ed.) **Short protocols in molecular biology**. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Wiley & Sons, 1995.
- Bereswill, S.; Pahl, A.; Bellemann, P.; Zeller, W.; Geider, K. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, n.11, p.3522-3526, 1992.
- Bradbury, J.F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. Kew: CAB International, 1986.332p.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Gaithersburg, v. 12, p.13-15, 1987.
- Freire, F.C.O.; Oliveira, A.D.S. Ocorrência do cancro bacteriano da videira no Estado do Ceará. **Comunicado Técnico Embrapa**, Fortaleza, n.62, 2001.
- Gagnevin, L.; Leach, J.E.; Pruvost, O. Genomic variability of the *Xanthomonas* pathovar *mangiferaeindicae* of mango bacterial black spot. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n.1, p. 246-253, 1997.
- Kado, C.I.; Heskett, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, p. 969-976, 1970.
- Kerkoud, M.; Manceau, C.; Paulin, J.P. Rapid diagnosis of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans*, the causal agent of blister spot of apple, by polymerase chain reaction using specifically designed *hrpL* gene primers. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n.10, p.1077-1083, 2002.
- Leite Jr., 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**, Washington, v.60, n.4, p.1068-1077, 1994.
- Leite Jr., R.P.; Jones, J.B.; Somodi, G.C.; Minsavage, G.V.; Stall, R.E. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* associated with pepper and tomato seed by DNA amplification. **Plant Disease**, St. Paul, v. 79, n.9, p.917-922, 1995.
- Lima, M.F.; Ferreira, M.A.S.V.; Moreira, W.A.; Dianese, J.C. Bacterial canker of grapevine in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, n.3, p.440-443, 1999.
- Lindgren, P.B.; Peet, R.C.; Panopoulos, N. J. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.168, n.2, p.512-522, 1986.
- Louws, F.J.; Rademaker, J.L.W.; De Bruijn, F.J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytopathogens: diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.37, p.81-125, 1999.
- Malavolta Junior, V.A.; Almeida, I.M.G.; Sugimori, M.H.; Ribeiro, I.J.A.; Rodrigues Neto, J.; Nogueira, E.M.C. *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videira no Estado do Piauí. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.25, n.1, p.27 1999a.(Resumo).
- Malavolta Junior, V.A.; Almeida, I.M.G.; Sugimori, M.H.; Ribeiro, I.J.A.; Rodrigues Neto, J.; Pires, E.J.P.; Nogueira, E.M.C. Ocorrência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videira no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.25, n.3, p.262-264, 1999b.
- Martin, R.R.; James, D.; Lévesque, C.A. Impact of molecular diagnostic technologies on plant disease management. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.38, p. 207-239, 2000.

20. Nascimento, A.R.P.; Mariano, R.L.R. Cancro bacteriano da videira: etiologia, epidemiologia e medidas de controle. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.1, p.301-307, 2004.
21. Nayudu, M.V. *Pseudomonas viticola* sp. nov., incitant of a new bacterial disease of grape vine. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v.73, p.183-186, 1972.
22. Pan, Y.-B.; Grisham, M.P.; Burner, D.M.; Legendre, B.L.; Wei, Q. Development of polymerase chain reaction primers highly specific for *Xanthomonas albilineans*, the causal bacterium of sugarcane leaf scald disease. **Plant Disease**, St. Paul, v.83, n.3, p.218-222, 1999.
23. Roberts, P.D.; Jones, J.B.; Chandler, C. K.; Stall, R.E.; Berger, R.D. Survival of *Xanthomonas fragariae* on strawberry in summer nurseries in Florida detected by specific primers and nested polymerase chain reaction. **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, n.11, p.1283-1288, 1996.
24. Rozen, S.; Skaletsky, H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (Ed). **Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology**. Totowa, NJ: Humana Press, 2000. p. 365-386. Disponível em: <<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>>. Acesso em: 28 maio 2002.
25. Sakthivel, N.; Mortensen, C.N.; Mathur, S.B. Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in artificially inoculated and naturally infected rice seeds and plants by molecular techniques. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.56, n.3/4, p.435-441, 2001.
26. Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, Washington, v.74, n.12, p.5463-5467, 1977.
27. Schaad, N.W.; Cheong, S.S.; Tamaki, S.; Hatziloukas, E.; Panopoulos, N.J. A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. **Phytopathology**, St. Paul, v.85, n.2, p. 243-248, 1995.
28. Song, W.Y.; Kim, H.M.; Hwang, C.Y.; Schaad, N.W. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* in rice seeds using BIO-PCR. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.152, p. 667-676, 2004.
29. Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choices. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, p.4673-4680, 1994.