



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fitopatologia

Variabilidade e tolerância ao cobre em
***Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, agente causal**
do cancro bacteriano da videira (*Vitis* spp.)

Eder Marques

Dissertação apresentada ao Departamento de
Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade de Brasília, como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Fitopatologia.

Brasília – DF

2007

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da Professora Dra. Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira, com apoio institucional e bolsa do CNPq.

Aprovado por:

Profa. Dra. Marisa A.S.V. Ferreira
Orientadora

Dra. Abi Soares dos Anjos Marques
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Prof. Dr. Carlos Hidemi Uesugi
Universidade de Brasília

A meu pai Antônio Marques (in memoriam), por nossa profissão,

pelos exemplos de honestidade e honra

Dedico.

AGRADECIMENTOS

... Inicialmente a *Deus* pela vida maravilhosa que tenho, pelas vitórias e pela dádiva de estar vivo e poder continuar a sonhar.

A profa. Marisa pela oportunidade de trabalho e orientação.

A possibilidade de poder ter me aberto ao *Amor* e vivenciar tudo o que pôde me oferecer.

Às *mulheres* da minha vida: Minha mãe *Jacira* pelos exemplos de sabedoria, honestidade, dignidade, honra e amor. E minhas irmãs *Andréa* & *Terla*, pela simples graça de serem minhas irmãs e por todas as conseqüências desse privilégio.

A minhas amigas *Iara* & *Sheila*, pelo apoio e amizade sincera.

A todos os *professores* do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos, em particular ao Prof. *Carlos Uesugi* pelas dicas e esclarecimentos.

Aos *colegas* de Pós-graduação, especialmente *Sarah*, *Ana Angélica* e *Caroline* pelos bilhetes, risos, furos, mancadas e tantos outros momentos inesquecíveis que passamos juntos nessa fase de nossas vidas.

A *Loiselene*, inicialmente pela amizade, paciência, incentivo, apoio e tantas dicas e ensinamentos que com certeza perdurarão.

Aos *funcionários* do Departamento de Fitopatologia. Em especial a *Kamila* a quem tenho imensa gratidão pela disposição, amizade e ajuda em numerosos momentos.

Aos meus *amigos* de graduação que persistem em continuar em minha vida, apesar de meu distanciamento.

Aos *familiares* ...

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS-----	i
INDICE DE FIGURAS-----	iii
RESUMO-----	v
ABSTRACT-----	vii
CAPÍTULO 1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E OBJETIVOS-----	1
1- Videira – importância-----	1
2- Doenças da videira no Brasil-----	3
3- Cancro bacteriano da videira-----	4
3.1- Histórico e distribuição geográfica-----	4
3.2- Sintomatologia-----	6
3.3- Etiologia-----	8
3.4- Diagnose-----	9
3.5- Epidemiologia e controle-----	10
3.5.1- Epidemiologia-----	10
3.5.2- Medidas de controle-----	13
3.5.2.1- Controle cultural-----	14
3.5.2.2- Controle químico-----	15
3.5.2.3- Controle genético-----	16
OBJETIVOS-----	18
CAPÍTULO 2- VARIABILIDADE MOLECULAR EM <i>XANTHOMONAS</i> <i>CAMPESTRIS</i> PV. <i>VITICOLA</i> -----	19
1- INTRODUÇÃO-----	19
OBJETIVOS-----	24
2- MATERIAL E MÉTODOS-----	25
2.1- Local e período de realização dos trabalhos-----	25
2.2- Isolados bacterianos-----	25

2.3- Cultivo e preservação dos isolados-----	27
2.4- Caracterização bioquímica de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> -----	27
2.5- Reação de hipersensibilidade em plantas de tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Santa Cruz)-----	27
2.6- Caracterização molecular de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> -----	28
2.6.1- Extração de DNA genômico-----	28
2.6.2- Quantificação do DNA genômico-----	29
2.6.3- Identificação com iniciadores (“primers”) específicos-----	29
2.6.4- rep-PCR-----	30
2.6.5- ITS-RFLP-----	31
2.6.5.1- Amplificação da região ITS-----	31
2.6.5.2- Digestão dos produtos de PCR-----	32
3- RESULTADOS-----	34
3.1- Caracterização bioquímica-----	34
3.2- Caracterização molecular-----	37
3.2.1- Identificação com iniciadores (“primers”) específicos-----	37
3.2.2- rep-PCR-----	38
3.2.3- ITS-RFLP-----	49
3.2.3.1- Amplificação da região ITS-----	49
3.2.3.2- Digestão dos produtos de PCR (ITS-RFLP)-----	50
4. DISCUSSÃO-----	52
CAPÍTULO 3- TOLERÂNCIA AO COBRE EM <i>XANTHOMONAS CAMPESTRIS</i> <i>PV. VITICOLA</i> -----	55
1- INTRODUÇÃO -----	55
OBJETIVOS-----	61
2- MATERIAL E MÉTODOS-----	62
2.1- Isolados bacterianos-----	62
2.2- Metodologia 1-----	62
2.2.1- Meio de cultura e produtos utilizados-----	62
2.2.2- Preparo das suspensões-----	64
2.2.3- Inoculação e avaliação-----	64

2.3- Metodologia 2-----	65
2.3.1- Meio de cultura e produto utilizado-----	65
2.3.2- Preparo das suspensões-----	65
2.3.3- Inoculação e avaliação-----	65
2.4- Detecção e caracterização de seqüências do gene <i>copA</i> em <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> -----	66
2.4.1- Amplificação do gene <i>copA</i> -----	66
2.4.2- Sequenciamento dos produtos de PCR amplificados com os “primers” <i>copAL</i> e <i>copAR</i> -----	67
2.4.3- Análise das seqüências-----	68
3- RESULTADOS-----	69
3.1- Metodologia 1-----	69
3.2- Metodologia 2-----	76
3.3- Detecção e caracterização de seqüências do gene <i>copA</i> em <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> -----	77
3.3.1- Análise com os primers <i>copA</i> -----	77
3.3.2- Análise das seqüências-----	78
4- DISCUSSÃO-----	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	83
ANEXOS-----	100

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Página
Quadro 1: Principais variedades de uvas para porta-enxertos, com sementes e sem sementes utilizadas no Vale do São Francisco.	2
Quadro 2: Produtos químicos mais utilizados em videira no Vale do São Francisco.	16
Quadro 3: Graus de suscetibilidade de variedades e cultivares de videira a <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i>	17
Tabela 1: Designação, origem e ano de coleta dos isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> utilizados neste estudo.	26
Tabela 2: Seqüências dos “primers” desenhados para a região correspondente ao gene <i>hrpB</i> de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> .	29
Tabela 3: Descrição dos “primers” utilizados para rep-PCR.	31
Tabela 4: Descrição dos “primers” utilizados na amplificação da região intergênica (16S – 23S) do DNA ribossomal.	32
Tabela 5: Caracterização bioquímica e reação de hipersensibilidade em folha de tomate dos isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> procedentes de diferentes áreas e coletados entre 2003 e 2006.	35
Tabela 6: Análise de restrição da região ITS do rDNA de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> com as enzimas <i>HaeIII</i> e <i>MspI</i> , indicando a posição dos sítios de restrição na seqüência e tamanho dos fragmentos gerados.	51
Tabela 7: Designação, origem e ano de coleta dos isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> utilizados no estudo de tolerância ao cobre.	63
Tabela 8: Descrição dos “primers” desenhados com base nas seqüências do gene <i>copA</i> de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> e <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> .	66
Tabela 9: Porcentagem do número médio de colônias de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> observado em meio MMCC contendo sulfato de cobre em diferentes concentrações em relação ao meio sem cobre.	72

Tabela 10: Porcentagem do número médio de colônias de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> observado em meio MMCC contendo oxiclreto de cobre em diferentes concentrações em relação ao meio sem cobre.	74
Tabela 11: Sensibilidade ao cobre em <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> expressa em CMI ($\mu\text{g/ml}$ de Cu^{++}), comparando-se áreas de coleta.	75
Tabela 12: Níveis de tolerância de isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> cobre <i>in vitro</i> , segundo metodologia utilizada por Araújo (2001), em meio NA.	76
Tabela 13: Comparação (NCBI – BLAST) do gene <i>copA</i> seqüenciado de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> com seqüências depositadas no GenBank.	78
Tabela 14: Número médio de colônias de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> observado <i>in vitro</i> em meio MMCC contendo sulfato de cobre em diferentes concentrações.	109
Tabela 15: Número médio de colônias de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> observado <i>in vitro</i> em meio MMCC contendo oxiclreto de cobre em diferentes concentrações.	110

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Cancro bacteriano da videira causado por <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> , em cv. Red Globe. A- Lesões angulares; B- Escurecimento das nervuras; C- Formação do cancro no caule; D- Lesões na gavinha; E- Necrose nas bagas; F- Seca da inflorescência e G- Lesões na ráquis.	7
Figura 2: Reação de hipersensibilidade induzida por <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> em folhas de tomate após 24 horas da inoculação.	36
Figura 3: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de PCR obtido com os “primers” Xcv1F – Xcv3R correspondente à região do “cluster” <i>hrpB</i> de diferentes isolados	37
Figura 4: Análise eletroforética dos fragmentos gerados através de BOX-PCR, a partir de DNA purificado de isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> .	39
Figura 5: Dendrograma baseado no método UPGMA, de acordo com os perfis de amplificação gerada por BOX-PCR.	40
Figura 6: Análise eletroforética dos fragmentos gerados através de ERIC-PCR, a partir de DNA purificado de isolados utilizados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> .	42
Figura 7: Dendrograma baseado no método UPGMA, de acordo com os perfis de amplificação gerada por ERIC-PCR.	43
Figura 8: Análise eletroforética dos fragmentos gerados através de REP-PCR, a partir de DNA purificado de isolados utilizados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> .	45
Figura 9: Dendrograma baseado no método UPGMA, de acordo com os perfis de amplificação gerada por REP-PCR.	46
Figura 10: Dendrograma baseado no método UPGMA, de acordo com os perfis de amplificação gerados por rep-PCR (REP, ERIC e BOX)	48

- Figura 11:** Amplificação de fragmentos gerados pelos “primers” C1 – L1 referentes à região espaçadora 16S – 23S (ITS) do DNA dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* 49
- Figura 12:** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8 % da região espaçadora 16-23S amplificada pelos “primers” C1 – L1 referentes (ITS) com o DNA purificado de diferentes isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e produtos digeridos com as enzimas de restrição *HaeIII* e *MspI*. 50
- Figura 13:** **Figura 13.** Evolução na tolerância ao cobre, expressa pela concentração mínima inibitória em $\mu\text{g/ml Cu}^{++}$, de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* coletados entre os anos de 1998 e 2006. 70
- Figura 14:** Variabilidade na tolerância ao cobre, expressa pela concentração mínima inibitória em $\mu\text{g/ml Cu}^{++}$, dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* coletados entre os anos de 1998 e 2006. 71
- Figura 15:** Eletroforese em gel de agarose 1 % do produto de PCR obtido com os “primers” *copAL* – *copAR* com DNA de diferentes isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. 77
- Figura 16:** Árvore filogenética obtida por Consensus Tree a partir do sequenciamento do gene *copA* de *X. campestris* pv. *viticola* e seqüências depositadas no GenBank de *X. campestris*. pv. *campestris*, *X. axonopodis* pv. *citri* e *X. oryzae* pv. *oryzae*. 79

RESUMO

O cultivo de uvas de mesa no Brasil tem se intensificado principalmente em áreas próximas ao Submédio do Vale do São Francisco. Essa região é responsável por 15 % da produção de uvas de mesa finas do país, correspondendo a cerca de 98 % das exportações brasileiras anuais de uva, tanto em volume quanto em valores de produção. Entretanto, muitos são os problemas fitossanitários que ocorrem nessa cultura. Dentre as doenças de etiologia bacteriana apenas o cancro bacteriano, causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (*Xcv*), apresenta hoje incidência expressiva e importância econômica em videira. Embora tenha sido relatada em 1998, acredita-se que a bacteriose já estivesse presente na região desde 1996, sem ter sido detectada. Assim torna-se importante monitorar a variabilidade das populações bacterianas ao longo dos anos, o que pode ser conseguido de maneira eficiente utilizando marcadores moleculares. Outro fator a ser considerado é o uso contínuo e muitas vezes indiscriminado de compostos cúpricos na agricultura o que pode levar a ocorrência de bactérias fitopatogênicas ou saprofitas resistentes ao cobre. Considerando a importância do cancro bacteriano para a viticultura no Brasil e buscando maior conhecimento sobre variabilidade do patógeno e seu comportamento quanto a tolerância aos cúpricos, foram objetivos deste trabalho: (1) Caracterizar a diversidade genética, através de rep-PCR, de isolados de *Xcv* coletados no Vale do São Francisco, entre os anos de 2003 e 2006, comparando-os aos isolados já caracterizados, coletados entre 1998 e 2001; (2) Determinar níveis de tolerância ao cobre em isolados de *Xcv* representativos de diferentes épocas (1998 a 2006) e áreas de coleta; (3) Detectar e caracterizar em *Xcv* a presença de regiões homólogas ao gene *copA* que confere resistência ao cobre em *Xanthomonas* spp.

Os “fingerprints” gerados por rep-PCR, a partir do DNA purificado de *Xcv* coletados em diferentes anos, áreas e variedades de *Vitis vinifera* L. foram eficientes e reprodutíveis, constituindo-se em uma importante ferramenta no estudo da genética populacional deste patógeno. Os resultados indicaram ter ocorrido uma possível estabilização da população heterogênea observada por Trindade *et al.* (2005), além de permitir a observação de bandas comuns e perfis homogêneos entre os isolados que podem

ser utilizados para o diagnóstico. Entretanto, não foi possível correlacionar, através dos estudos das seqüências repetitivas, a origem geográfica, a época de coleta ou a cultivar de origem dos isolados com os perfis genômicos.

Nos testes de tolerância *in vitro* aos íons de cobre, de uma forma geral observou-se uma evolução no crescimento da tolerância ao cobre ao longo dos anos, em que isolados de *Xcv* foram coletados nas áreas de ocorrência do cancro bacteriano de 1998 a 2006. Os resultados do presente estudo confirmam aqueles já relatados anteriormente, de que as estirpes brasileiras apresentaram variabilidade na tolerância ao cobre e que esta tolerância ocorre naturalmente nas regiões produtoras. Araújo (2001) mostrou que essas estirpes mais tolerantes ocorrem na região de Petrolina, e no presente trabalho, demonstrou-se que também ocorrem em outras áreas como Bahia e Piauí. Amplificações com os “primers” desenhados a partir de seqüências do gene *copA* de *X. axonopodis* pv. *citri* e *X. campestris* pv. *campestris* foram observadas para todos os isolados de *Xcv* testados. A alta homologia entre os produtos das amplificações com os “primers” *copAR* e *copAL* a partir do DNA dos isolados de *Xcv* com o gene *cop A*, confirmou a existência do gene em *Xcv*. A árvore filogenética gerada com alta reprodutibilidade mostrou maior distância de *Xcv* em relação a *X. oryzae* pv. *oryzae* e *X. campestris* pv. *campestris* e maior proximidade com *X. axonopodis* pv. *citri*. Este fato pode ser um indicativo de maior afinidade de *X. campestris* pv. *viticola* com a espécie *X. axonopodis* do que com *X. campestris*, confirmando as observações de Takita *et al.* (2004) em trabalho analisando a região *rpf*.

ABSTRACT

The production of table grapes (*Vitis vinifera* L.) in Brazil has increased mainly in the irrigated areas of the “Submédio” of the São Francisco valley, northeastern Brazil. This region is responsible for 15 % of the grape production of the country, corresponding to nearly 98 % of the annual exports. Among the many phytosanitary problems that affect grape production, bacterial canker is the most important bacterial disease affecting several *V. vinifera* cultivars in that region. The disease is caused by *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (*Xcv*). Although it was reported in 1998, it is believed that it has been present in the region since 1996, without being detected. It is important to monitor the population variability through time, which can be achieved by using molecular markers. Another relevant fact is the continuous, excessive and frequently inadequate use of copper-based fungicides that can lead to resistance in bacteria. Considering the importance of bacterial canker for grape production in Brazil and the lack of information on pathogen variability and its behavior regarding copper tolerance, the objectives of this work were: (1) to characterize the genetic diversity, using rep-PCR, among *Xcv* strains collected from 2003 to 2006, comparing them to a population already characterized, collected between 1998 and 2001; (2) to determine tolerance levels to copper in *Xcv* strains, selected to represent different collection years (1998 to 2006) and collection sites; and (3) to detect and characterize in *Xcv* the presence of homologous regions to the *copA* gene, which is involved in copper resistance in *Xanthomonas* spp.

The fingerprints generated by rep-PCR using bacterial purified DNA from isolates collected in different years, areas and from different grape cultivars were reproducible and the results indicated lower levels of polymorphism among the isolates collected from 2003-2006 than among the isolates previously characterized by Trindade *et al.* (2005). The profiles were generally very homogeneous and several common bands among isolates were detected. However, it was not possible to correlate geographic origin, collection year or cultivar with the rep-PCR genomic patterns.

In vitro tests were conducted to assess tolerance to copper ions in *Xcv*. The results showed a general increase in copper tolerance from 1998 through 2006 and also showed

variation in the minimum inhibitory concentration among the isolates. Previous studies demonstrated that this tolerance occurs naturally in the Petrolina region (Pernambuco state). Here we observed variation in tolerance also in isolates from Bahia and Piauí states. PCR-amplifications with primers (*copAR* and *copAL*) selected from the *copA* sequences of *X. axonopodis* pv. *citri* and *X. campestris* pv. *campestris* were observed for all *Xcv* isolates. After sequencing of the 925-bp PCR product, high sequence homology between *Xcv* sequences and those from *X. axonopodis citri* and *X. campestris* pv. *campestris* was observed, thus confirming the presence of the *copA* gene in *Xcv*. The phylogenetic analysis showed a closer relationship between *Xcv* and *X. axonopodis* pv. *citri* than with *X. oryzae* pv. *oryzae* or *X. campestris* pv. *campestris*. This suggests a closer proximity with the species *X. axonopodis* than with *X. campestris*, confirming the observations of Takita *et al.* (2004) when analyzing the *rpf* gene region.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1- Videira – importância

A família Vitaceae é dividida em várias subfamílias que compreendem um grande número de gêneros e espécies, dentre os quais se destacam as espécies *Vitis vinifera* L. (de origem européia) e *Vitis labrusca* L. (de origem americana), que são as mais cultivadas devido às suas características agrônomicas superiores (Teixeira & Azevedo, 1996).

As uvas finas de mesa são variedades da espécie *V. vinifera*, em geral, suscetíveis às doenças fúngicas e altamente exigentes em tratamentos culturais. Todas as variedades exportadas pelo Brasil estão incluídas nesse grupo ou são híbridas entre elas e alguma outra espécie de *Vitis* (Tavares, 2004).

A produção de uvas brasileira destina-se basicamente a vinificação, uvas para mesa, para passas, sucos e doces (Leão, 2000).

Apesar da superioridade de produção dos países europeus, o cultivo de uva encontra-se espalhado por todos os continentes. No Brasil a viticultura começou por volta de 1553 com a colonização, mas somente no século XIX adquiriu significativa importância econômica devido à intensificação do cultivo de variedades como Isabel, Concord, Goethe e outras americanas (Pommer & Maia, 2003), desenvolvendo pólos vinícolas em São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, impulsionados pelas correntes imigratórias italianas (Leão & Possídio, 2000).

Tendo em vista o crescimento das áreas de produção, além da maior participação no mercado internacional, o plantio de uva no Brasil tem se intensificado. Presente no Nordeste brasileiro desde o século XVI (Leão & Possídio, 2000), em regiões como Petrolina – PE e Juazeiro – BA (Submédio do Vale do São Francisco), a viticultura intensificou-se nesta região na década de 50 com um aumento expressivo de produção na década de 90 sendo responsáveis atualmente por 15 % da produção de uvas de mesa finas do país. A participação da produção dessa região corresponde à cerca de 98 % das exportações brasileiras anuais de uva, tanto em volume quanto em valores de produção. Outras áreas

como Maringá e Marialva no Norte do Paraná, Jales no Nordeste de São Paulo e o município de Pirapora no Norte de Minas Gerais também começam a se destacar como pólos produtores de uvas de mesa (Lima & Moreira, 2002).

Essa expansão da viticultura, especialmente no Vale do São Francisco, se deve a evolução tecnológica (Freire & Oliveira, 2001; Camargo, 2003) em viticultura tropical, fazendo com que a produção de uvas de mesa ocorra durante todo o ano, garantindo além do estabelecimento interno, a exportação em períodos de escassez no mercado internacional (Camargo, 2003). As principais variedades utilizadas no Submédio do Vale do São Francisco estão indicadas no **Quadro 1**.

Quadro 1. Principais variedades de uvas para porta-enxertos, com sementes e sem sementes utilizados no Vale do São Francisco*.

Porta-enxertos	Com sementes	Sem sementes
IAC 313 (Tropical)	Itália ou Piróvano 65	Perlette
IAC 572 (Jales)	Piratininga	Catalunha
IAC 766 (Campinas)	Red Globe	Superior Seedles
SALT Creek	Benitaka	Centennial Seedless
Dodge Ridge	Patrícia	Flame Seedless
Courdec 1613	Alphonse Labllée ou Ribier	Vênus
Harmony 420-A	Dattier de Beritouth	Marroo Seedles
Paulsen 1103	Christmas Rose	---

*Fonte: Leão (2002).

Em termos globais a produção mundial de uva de mesa, entre os anos de 1996 a 2004, foi em média de 10 milhões de t/ano. Já a produção brasileira de uva, destinada à mesa, produção de vinho e outros fins industriais, foi de 1.298.874 t, no ano de 2004 em uma área colhida de 71.306 ha. A região Sul apresenta-se como a maior produtora (826.348 t); entretanto, no Sudeste (238.634 t) e no Nordeste (233.829 t) a cultura está em franca expansão (Agriannual, 2005).

2- Doenças da videira no Brasil

Ao longo da história do cultivo de plantas o homem tem sido considerado um dos grandes agentes de dispersão de pragas e doenças. Danos irreparáveis foram causados ao transportar fitopatógenos involuntariamente. Especificamente no caso da videira podem ser citados os exemplos clássicos da introdução do oídio (*Uncinula necator* De Bary {Shear}) e do míldio (*Plasmopara viticola* Berk. et Curtis ex. de Bary) na Europa no século XIX. No Brasil exemplos recentes são a ocorrência da doença conhecida como declínio da videira (*Eutypa lata* Pers.), na região de Jundiaí, São Paulo e da ferrugem (*Phakopsora euvtitis* Ono) com seu primeiro relato no município de Jandaia do Sul – PR (Tessmann *et al.*, 2003).

Entre as doenças de origem fúngica que afetam a videira pode-se citar: podridão-seca (*Botryodiplodia theobromae* Pat.); oídio (*Uncinula necator*); mofo-cinzento (*Botrytis cinérea* Pers.); antracnose (*Elsinoe ampelina* Shear); fusariose (*Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* W.L.Gordon); declínio da videira (*Eutypa lata*); a ferrugem (*Phakopsora euvtitis*) (Amorim & Kuniyuki, 2005; Tavares, 2004), míldio (*Plasmopora viticola*) (Tavares, 2004); mancha da folha (*Mycosphaerella personata* B.B.Higgins); podridão amarga (*Greeneria uvicola* {Berk. & M.A Curtis} Punith.) e a podridão da uva madura (*Glomerella cingulata* Stoneman) (Amorim & Kuniyuki, 2005).

Entre os nematóides destaca-se o das galhas (*Meloydogyne* spp.), e entre os vírus, o vírus do enrolamento da folha da videira (*Grapevine leafroll-associated virus*); o vírus da folha em leque (*Grapevine fanleaf virus*) ou dos entrenós curtos da videira; o vírus do intumescimento dos ramos da videira (*Grapevine corky bark disease*); doenças das caneluras do tronco da videira (*Grapevine stem pitting disease*); manchas ou mosaico das nervuras (*Grapevine fleck virus*) e a necrose das nervuras (*Vein necrosis disease*) (Amorim & Kuniyuki, 2005; Tavares, 2004).

Dentre as doenças de etiologia bacteriana, apenas duas, causadas por *Agrobacterium vitis* e *Agrobacterium* sp., haviam sido descritas até o ano de 1998. A formação de galhas induzida pela bactéria não apresenta expressão para a cultura e já foi descrita em parreirais dos estados de Minas Gerais, Rio Grande do Norte, São Paulo e no Submédio do Vale do São Francisco (Lima & Moreira, 2002). Em 1998, uma nova doença, o cancro bacteriano, foi detectada no Vale do São Francisco e apresenta hoje incidência expressiva e importância

econômica em videira no Brasil. Embora relatada em 1998, acredita-se que a bacteriose já estivesse presente na região desde 1996, sem ter sido detectada (Lima *et al.*, 1999; Lima & Moreira, 2002).

3- Cancro bacteriano da videira

3.1- Histórico e distribuição geográfica

O primeiro relato do cancro bacteriano da videira ocorreu na Índia em 1969, na variedade Anab-e-Shahi, causado por uma bactéria classificada inicialmente como *Pseudomonas viticola* sp. nov. por Nayudu (1972), e posteriormente reclassificada como *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Xcv) por Dye, em 1978 (Lima & Moreira, 2002).

Em 1998, no pólo Petrolina (PE) – Juazeiro (BA) foi identificado em lavouras de cultivo comercial, o segundo relato da bacteriose no mundo (Lima *et al.*, 1999; Malavolta Jr. *et al.*, 1999). As plantas apresentavam sintomas nas folhas, ramos, ráquis e nas bagas. As variedades mais afetadas foram Red Globe e as variedades sem sementes, principalmente aquelas oriundas de Thompson Seedless, com perdas de 10 a 100 % (Lima & Moreira, 2002). Inicialmente em plantios novos (2 – 3 anos após enxertia) a incidência era de 100 % de plantas infectadas (Lima *et al.*, 1999). Em maio de 1998 sintomas característicos da doença foram observados em ramos e folhas das variedades Red Globe, Itália e Ribier em cultivos comerciais da região de Teresina – PI, sendo, portanto, o segundo relato do patógeno no país (Malavolta Jr. *et al.*, 1995a). Entre os anos de 1998 e 1999 o cancro bacteriano já havia sido encontrado em parreirais de vários municípios de Petrolina e Santa Maria da Boa Vista – PE, além de outros municípios da Bahia. Inspeções fitopatológicas realizadas no ano de 2001 no Município de Jaguaruana – CE comprovaram a ocorrência do cancro bacteriano nas variedades Red Globe, Flame e Superior (Freire & Oliveira, 2001).

Em julho de 2006, em plantações de uva de Boa Vista – RR, verificou-se a presença de plantas com sintomas de cancro e necrose nas folhas. Testes realizados pelo laboratório de Fitopatologia da Embrapa confirmaram o primeiro relato do cancro bacteriano da videira em Roraima e o quinto relato da bacteriose no Brasil. As plantações de uva em Boa Vista

têm sido estabelecidas com material propagativo oriundo de Petrolina – PE, local de ocorrência da bacteriose e esta pode ter sido a forma de introdução da doença no Estado (Halfed-Vieira & Nechet, 2006).

A introdução do patógeno no Brasil ocorreu provavelmente por meio de material propagativo originário da Índia (Malavolta Jr. *et al.*, 1999). Segundo Freire & Oliveira (2001) o patógeno foi introduzido inadvertidamente por produtores do Vale do São Francisco, diretamente da Índia, através de estacas da variedade Red Globe. Estudo de variabilidade genética, realizados por Trindade *et al.* (2005), mostraram que os isolados brasileiros e o isolado tipo NCPPB 2475, da Índia, possuem perfis genômicos semelhantes, o que suporta a hipótese para esta via de introdução.

Com a ocorrência e a elevada incidência do cancro bacteriano, praticamente eliminou-se a produção da variedade Red Globe na Região do Vale do São Francisco (Gava, 2006). O principal prejuízo verificado nas variedades suscetíveis à doença foi à redução na produção. Plantas infectadas, geralmente, produzem cachos com sintomas de cancro no engão, inutilizando os frutos para a comercialização. Em 1999, 100 ha de videiras em produção foram erradicadas no Vale do São Francisco (Lima *et al.*, 1999). As perdas na região de Petrolina, foram estimadas em mais de 3 milhões de reais em 120 ha (Araújo, 2001).

Em levantamento realizado no início do ano de 2004 observou-se a presença de sintomas da doença em 17 de 18 das propriedades visitadas, com incidência variando entre 10 e 100 % nas parcelas amostradas da cv. Festival e entre 92 e 100 % nas áreas com Red Globe (Lopes & Nascimento, 2004).

Segundo a Instrução Normativa SDA nº 38, de 14 de outubro de 1999, Xcv é classificada como praga quarentenária A2. As Pragas Quarentenárias A2 são aquelas de importância econômica potencial, já presentes no país, mas que não se encontram amplamente distribuídas e estão sob programa oficial de controle. Essa IN, assim como a Instrução Normativa nº 9 de 20 de abril de 2006 estabelecem medidas de prevenção, controle e erradicação do patógeno.

3.2- Sintomatologia

Nas folhas as lesões são escuras, pequenas (1 – 2 mm), angulares, distribuídas de forma esparsa (**Figura 1**), mas podendo ocorrer em grande número ao redor das nervuras ou de ferimentos, circundadas ou não por halo amarelado (Lima & Moreira, 2002). Quando coalescem causam crestamento e destruição de extensas regiões do limbo foliar. Em alguns casos também pode ocorrer formação de manchas setoriais, pardacentas, semelhantes às causadas por *Xylophilus ampelinus* (Freire & Oliveira, 2001), agente causal da queima da videira, doença ainda não relatada no Brasil (Marques & Fonseca, 2005). Em estádios mais avançados de infecção, as folhas tornam-se amarelas e caem.

Mais tarde os sintomas podem surgir nas nervuras principais e nos pecíolos das folhas, como manchas escuras alongadas e irregulares que, sem seguida, evoluem formando cancos. Em ramos verdes, surgem estrias e/ou manchas escuras irregulares, cujas áreas, posteriormente, tornam-se necróticas e com fendilhamentos longitudinais de coloração negra que, com o agravamento da infecção, gradualmente, alargam-se expondo os tecidos internos. A infecção pode atingir o sistema vascular da planta, tornando-se sistêmica. Em corte longitudinal de ramos infectados, principalmente próximos aos cancos, constata-se a presença de descoloração vascular, em uma pequena extensão (Lima & Moreira, 2002).

Na inflorescência ocorre necrose e os sintomas podem surgir a partir da extremidade em direção a base. Na ráquis ou engaço dos cachos verificam-se sintomas similares aos observados em ramos, com a presença de manchas escuras e a formação de cancos. Em bagas, podem ocorrer lesões escuras e levemente arredondadas. Em cachos já formados, há murcha de bagas, após necrose da ráquis e dos pedicelos. O ataque da doença é mais intenso nos frutos, quando a infecção ocorre no início da frutificação, e os sintomas são constatados na extremidade dos cachos ou no ponto de inserção do pedúnculo no ramo (Lima & Moreira, 2002).

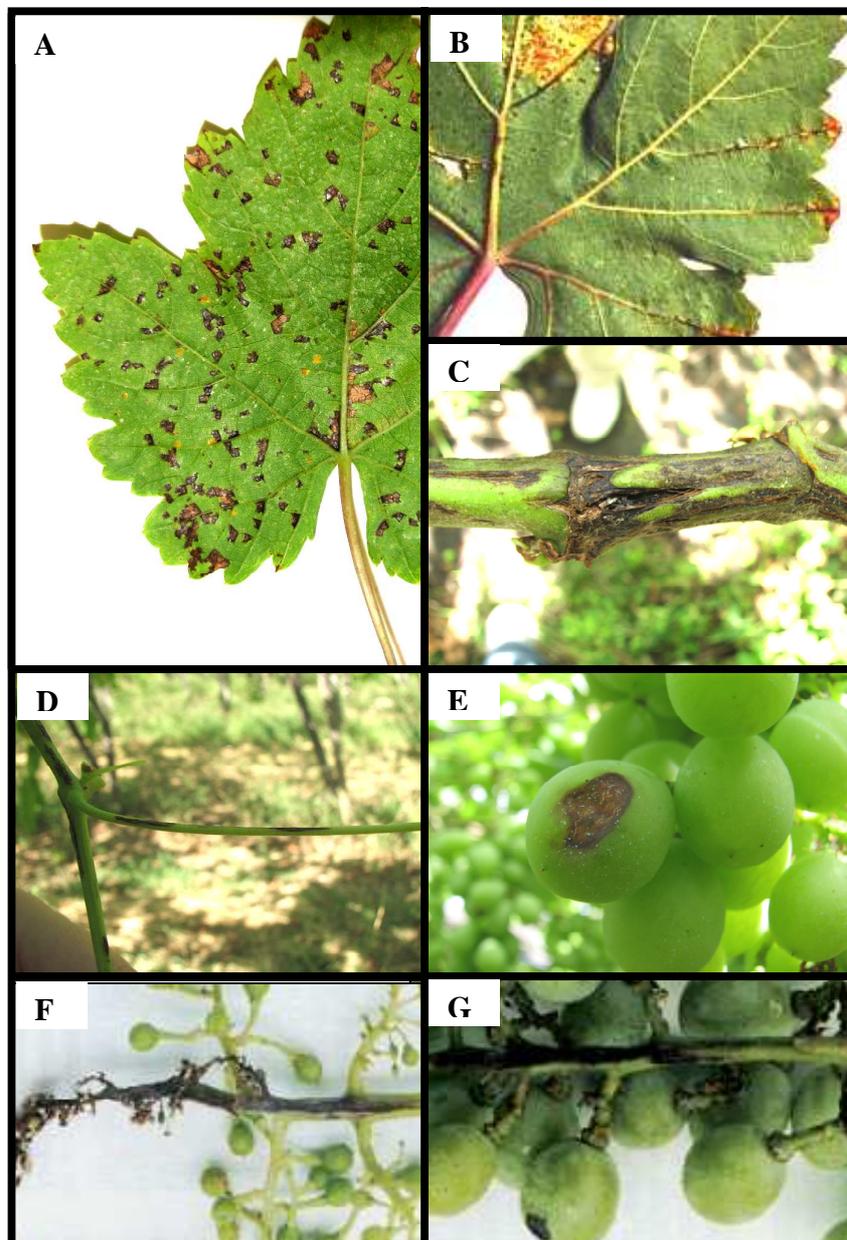


Figura 1. Cancro bacteriano da videira causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, em cv. Red Globe. **A-** Lesões angulares; **B-** Escurecimento das nervuras; **C-** Formação do cancro no caule; **D-** Lesões na gavinha; **E-** Necrose nas bagas (L.C. Trindade); **F-** Seca da inflorescência e **G-** Lesões na ráquis (Lima *et al.*, 1999).

A severidade dos sintomas da doença varia segundo o nível de tolerância da variedade e segundo condições ambientais. A variedade Red Globe e algumas variedades sem sementes, principalmente aquelas oriundas de Thompson Seedless, mostram-se mais suscetíveis. Focos da doença também foram identificados nas variedades Itália, Festival, Brasil, Piratininga, Patrícia, Benitaka, Ribier, Superior e Catalunha, entretanto com incidência variável, sobretudo em Itália e Benitaka, que apresentaram, inicialmente, maior tolerância a doença, quando comparadas às outras variedades (Lima & Moreira, 2002).

No Submédio do São Francisco, a incidência e a severidade da doença em variedades suscetíveis tem sido maior no primeiro semestre do ano, devido à ocorrência de chuvas, condição que propicia a disseminação e a penetração da bactéria na planta. Operações que ocasionam ferimentos nas plantas, como desbrota e poda, realizadas nesse período, podem favorecer a ocorrência da doença em variedades suscetíveis. O período seco é o mais propício para o manejo (Lima & Moreira, 2002).

3.3- Etiologia

O agente causal do cancro bacteriano da videira foi inicialmente identificado através de testes bioquímicos, fisiológicos e de patogenicidade e classificado como *Pseudomonas viticola* sp. nov. (Nayudu, 1972). Posteriormente Dye (1978) propôs alterações na classificação designando-a como *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye.

Considerando a nomenclatura proposta por Vauterin *et al.* (1995; 2000), o patógeno deve ser referido como *X. sp. pv. viticola* (Nayudu) Vauterin *et al.*, uma vez que *Xcv* não foi incluída no sistema de reclassificação proposto, em 1995. Garrity *et al.* (2005) classificam *Xcv* no Domínio *Bacteria*, Classe *Gammaproteobacteria*, Ordem *Xanthomonadales*, Família *Xanthomonadaceae* e Gênero *Xanthomonas*, mas dentro das espécies incertas.

Em trabalho realizado analisando-se a região *rpf* (Regulação de Fatores de Patogenicidade) na diferenciação de espécies de *Xanthomonas*, Takita *et al.* (2004) observaram que *Xcv* não apresentou esta região, mostrando maior similaridade com *X. axonopodis* pv. *citri*, sendo dessa forma agrupada com outras espécies de *Xanthomonas*. Os autores concluíram que *Xcv* não pertence ao grupo de patovares de *X. campestris*.

Apesar de pertencer ao gênero *Xanthomonas*, *Xcv* não produz o pigmento xanthomonadina. Apresenta células em forma de bastonete, medindo de 1,2 a 2,5 μm (Nayudu, 1972), monocapsuladas, possuindo apenas um flagelo polar. As colônias são arredondadas, apigmentadas, convexas, brilhantes e de bordos lisos em meio agar-nutritivo, oxidativas e gram negativas. *Xcv* não produz pigmento fluorescente em meio King's B e não apresenta atividade de urease e oxidase, além de não utilizar asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio, nem apresentam inclusões de poli- β -hidroxibutirato. A tolerância a NaCl varia entre 1 a 2 %, segundo (Lima *et al.*, 1999), entretanto Nascimento *et al.* (2005a) verificaram que cresce em até 3 %, sendo que a 6 % é letal. *Xcv* cresce bem em sais de amônio e ácido glutâmico, embora seu melhor crescimento seja em caseína hidrolisada (Nayudu, 1972). Produz ácidos a partir de glucose, manose, galactose, trealose, celobiose e frutose (Lima *et al.*, 1999), mas não de dulcitol, glicerol, m-inositol, lactose, rafinose e sorbitol. Malavolta Jr. *et al.* (1999) não detectaram a produção de ácidos a partir de celobiose. Seu crescimento médio se dá por volta de 48 a 72 h, a 28 °C – 33 °C, não crescendo a 41 °C (Malavolta Jr. *et al.*, 1999; Lima *et al.*, 1999). Nascimento *et al.* (2005a) verificou um crescimento ótimo entre 27 – 29 °C, não crescendo a 40 °C. O pH ótimo é de 7,5. A reação de hipersensibilidade é negativa em folhas de fumo (*Nicotiana tabacum* cv. White Burley), mas positiva em folhas de tomate (*Lycopersicum esculentum* cv. Santa Clara) (Malavolta Jr. *et al.*, 1999).

3.4- Diagnose

A diagnose do cancro bacteriano da videira pode ser realizada com base na avaliação dos sintomas, isolamento em meio de cultura, realização de testes bioquímicos e testes de patogenicidade.

Esforços estão sendo feitos no sentido de se desenvolver métodos de diagnóstico mais eficientes para a bacteriose, tais como métodos moleculares e imunológicos. Nesse sentido, Araújo *et al.* (2005) produziram anticorpos policlonais que se mostraram altamente reativos contra o patógeno, podendo ser empregados no diagnóstico da doença. Paralelamente, Trindade *et al.* (2007) desenvolveram um método de detecção molecular de

Xcv a partir do sequenciamento parcial do gene *hrpB* e posterior seleção de oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) para uso em PCR (reação em cadeia da polimerase).

3.5- Epidemiologia e controle

3.5.1- Epidemiologia

O cancro bacteriano da videira é uma doença nova na cultura da videira no Brasil, tendo sido relatada apenas na Índia, onde não tem causado grandes prejuízos (Nascimento & Mariano, 2004). Apesar da importância dessa bacteriose, os primeiros estudos epidemiológicos no Brasil, foram realizados recentemente por Nascimento *et al.* (2005b), que propuseram uma escala diagramática para avaliação dos sintomas e severidade da doença.

Segundo Robbs & Neto (1999) a infecção de *Xcv* ocorre por meio de aberturas naturais ou micro injúrias nos tecidos ainda verdes do filoplano de *V. vinifera*. A bactéria sobrevive de um ciclo para o outro em plantas infectadas, ou como epifítica em órgãos da parte aérea de plantas, em condições de umidade e temperaturas elevadas.

Além de infectar videira, *Xcv* também infecta naturalmente plantas de neem (*Azadirachta indica*, Meliaceae), *Phyllanthus maderaspatensis* (Euphorbiaceae) (Nayudu, 1972).

Em trabalho de levantamento do cancro bacteriano da videira em parreirais do Submédio do Vale do São Francisco também se observou infecção natural de *Xcv* em plantas invasoras como *Alternanthera tenella*, *Amaranthus* sp., *Glycine* sp., *Senna obtusifolia*, *Mormordica charantia* e *Phyllanthus* sp. (Peixoto *et al.*, 2006).

No Brasil inoculações artificiais em mangueira (*Mangifera indica*), cajueiro (*Anacardium occidentale*), cajá-manga (*Spondias dulcis*), umbuzeiro (*Spondias tuberosa*) e aroeira (*Schinus terebenthifolius*) resultaram em infecções características, apesar de infecções naturais não terem sido registradas nessas espécies (Araújo *et al.*, 1999). Em plantas de neem foram observadas lesões necróticas, sendo possível o reisolamento da

bactéria em cultura pura (Moreira *et al.*, 2006). Também a partir de inoculações artificiais Peixoto *et al.* (2006) observaram sintomas típicos do cancro em plantas invasoras como *Chamaesyce hirta* (erva-de-santa-luzia), *Dactyloctenium aegyptium* (L.) Willd (capim-pé-de-galinha), *Eragrostis pilosa* (capim-meloso), *Euphorbia prostata* (quebra-pedra rasteiro) e *Pilea* sp. (madrepérola). Por outro lado, Braga & Ferreira (2000) não observaram sintomas da doença inoculando-se artificialmente a bactéria em plantas de fumo, cebola, tomate, beterraba, cenoura, repolho, pepino, soja, feijão e alface.

Dessa forma, o neem aparece como um hospedeiro alternativo do patógeno que pode servir como fonte de inóculo. Na Índia, o neem também é utilizado como quebra-vento e seu extrato como inseticida natural. A infecção desta planta por *Xcv* leva a manchas foliares e cancos em ramos e pecíolos, sintomas semelhantes aos observados em videira (Lima & Moreira, 2002).

A maioria dessas espécies potencialmente hospedeiras de *Xcv* ocorrem naturalmente no Submédio do São Francisco, outras são amplamente cultivadas em todas as regiões como a mangueira (Lima & Moreira, 2002). Robbs & Neto (1999), levantaram a possibilidade de um ciclo epifítico de *Xcv* em mangueiras, devido às semelhanças na sintomatologia e epidemiologia entre *Xcv* e *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*.

As principais fontes de inóculo são células bacterianas liberadas dos cancos e veiculadas por meio de gotas de água a média e curta distâncias, infectando tecidos suscetíveis que surgem em função da poda. Tais cancos representam importante nicho de sobrevivência, onde o patógeno permanece latente e inerte na estação seca, passando a exsudar abundantemente com as chuvas (Robbs & Neto, 1999).

A disseminação da bactéria também pode ocorrer através de restos de cultura infectados e deixados no pomar. Da mesma forma, pode ser veiculada em roupas, veículos, contentores, tesouras, canivetes e luvas não desinfestados utilizados na colheita de frutos de plantas doentes. Tratos culturais como desbrota, poda, raleio de bagas, colheita, torção de ramos, capina, gradagem, roçagem, pulverizações e aplicação de herbicidas por barra favorecem a disseminação da bactéria no parreiral. A irrigação do tipo sobrecopa, tais como, a aspersão convencional e pivô central também favorecem a distribuição da doença (Nascimento & Mariano, 2004).

Apesar do curto período chuvoso na região do Submédio São Francisco, a disseminação da bactéria ocorre mais rapidamente e a infecção pode ser mais intensa durante esse período. O vento seco não dissemina a bactéria, sendo necessário sempre a presença de água. A transmissão do cancro bacteriano dentro do pomar pode ocorrer mais rapidamente que entre pomares. Todos os agentes de ferimentos são importantes para a penetração de bactéria destacando-se os tratos culturais e ventos fortes (Lima & Moreira, 2002).

Após a penetração, a bactéria multiplica-se rapidamente colonizando os espaços intercelulares e atingindo o sistema vascular, sendo transmitida a todos os órgãos da planta (Nascimento & Mariano, 2004). Fatores como temperaturas em torno de 25 a 30 °C e alta umidade relativa do ar proporcionam condições favoráveis ao desenvolvimento do patógeno.

Nascimento *et al.* (2000) observaram que mesmo após a eliminação da parte aérea, de plantas da cv. Red Globe infectadas com *Xcv*, os ramos emitidos após brotação apresentavam sintomas da doença caracterizando a infecção latente em porta-enxertos da cv. Tropical 572, até então não relatado. No mesmo ano Lima & Ferreira observaram que plantas da cv. Red Globe enxertadas com Tropical 576 com 100 % de infecção de *Xcv* apresentavam infecção latente dos porta-enxertos. Observaram também que as plantas mesmo após recepa, eliminando a copa suscetível, e posterior enxertia com a mesma cultivar, a doença reincidia.

Os sintomas em variedades suscetíveis são observados após a primeira poda, na floração, início da frutificação na fase de chumbinho, no raleio das bagas e, em alguns casos, na maturação dos cachos e na fase de repouso (Lima & Moreira, 2002).

Araújo (2001) propôs que a fase parasítica de *Xcv* ocorre no período chuvoso no semi-árido do São Francisco, período que vai de novembro a março, quando surgem sintomas foliares permanentes, fornecendo fonte de inóculo para a disseminação local. Na estação seca não se observam sintomas devido ao fato de que o patógeno sobrevive protegido no interior dos tecidos vegetais e/ou como epífita (residente) sobre as folhagens da videira.

O patógeno pode ser disseminado a longas distâncias introduzido em parreirais isentos da doença, veiculado por mudas ou bacelos infectados, os quais irão originar plantas

doentes (Araújo, 2001), tanto em material de copa como de porta-enxerto (Lima & Moreira, 2002).

Ramos e folhas de videira com e sem sintomas do cancro, revelam intensa colonização de *Xcv* (Araújo *et al.*, 2004). Observações feitas ao microscópio eletrônico de varredura permitiram confirmar que as células bacterianas aderem aleatoriamente às superfícies vegetais por meio de fixação apolar em monocamada, raramente formando agregados e que maior frequência dessa adesão ocorre sobre nervuras e tricomas, no limbo foliar. Assim, pressupõe-se que, uma vez as bactérias atingindo um sítio favorável, sua habilidade de resistir à remoção constitui-se em vantagem seletiva, sendo responsável pelo aumento e estabilidade da população residente (Araújo, 2001). Essas populações constituem importante fonte de inóculo do patógeno. Tecidos internos de folhas, ramos e pecíolos mostram perda de integridade celular devido à presença de matriz polissacarídica. Esta observação pode ser um indicativo da formação de biofilmes (Costerton *et al.*, 1995) em *Xcv* o que poderá ser investigado em estudos futuros.

Através da imunomarcagem com partículas de ouro, Araújo e colaboradores (2004) verificaram a presença de densa massa bacteriana nos tecidos do parênquima xilemático, levando a uma maceração dos tecidos devido à desfibrilação da parede celular do hospedeiro, o que ocasiona um congestionamento de água nos tecidos infectados. Com o progresso da doença o patógeno multiplica-se nos espaços intercelulares, alcançando o parênquima, feixes vasculares do xilema e floema adjacentes caracterizando a colonização sistêmica da bactéria.

3.5.2- Medidas de controle

O manejo para esta doença é complexo devido à ausência de produtos registrados (Gava, 2006). A fase crítica para estabelecer estratégias para o manejo do cancro da videira é a época das chuvas, quando os parreirais devem estar protegidos (Nascimento & Mariano, 2004).

A Embrapa Semi-Árido propôs a implantação do monitoramento de doenças na cultura da uva no Submédio do Vale do São Francisco, visando reduzir os prejuízos

provocados por patógenos aumentando, assim, as chances de sucesso das medidas de controle e a racionalização no uso de agrotóxicos pela redução no número de aplicações (Tavares *et al.*, 2001).

3.5.2.1- Controle cultural

A recomendação de manejo em pomares já afetados é feita com base em práticas que visam interferir no ciclo da doença, principalmente na sobrevivência e disseminação da bactéria (Mariano, 2006).

Material propagativo e mudas constituem os meios mais eficientes de disseminação do cancro bacteriano, principalmente a longas distâncias, o que reforça a necessidade de rigorosa inspeção fitossanitária. Além disso, outras exigências fitossanitárias são feitas, pela Instrução Normativa nº 09 de 20 de abril de 2006, como medidas de prevenção, controle e erradicação de *Xcv* e fixação de normas sobre exigências, critérios e procedimentos, tais como:

- a. Coleta de material contaminado para diagnóstico em laboratório oficial;
- b. Se confirmada a incidência da bactéria, aplicar medida de erradicação (poda drástica ou eliminação total das plantas);
- c. Tratamento das plantas podadas com 0,1 % de cobre metálico;
- d. Inspeções periódicas em plantas remanescentes ou circunvizinhas as podadas e/ou erradicadas a cada 8 dias, durante 60 dias;
- e. Cumpridas as exigências deve-se liberar as áreas focos;
- f. Obediência à legislação de sementes e mudas quanto a produção de material propagativo;
- g. Proibição do trânsito de plantas de videira e suas partes das propriedades ou talhões onde for constatada a doença;
- h. Adoção de exigências para variedades e cultivares suscetíveis a bacteriose, tais como:
 - Material para enxertia sem sintomas;
 - Viveiros cercados e com pédilúvio na entrada;
 - Restrição de pessoas estranhas ao interior do viveiro;

- Desinfecção de equipamentos e ferramentas com álcool iodato;
- i. Para mudas certificadas (com CFO – Certificado Fitossanitário de Origem) observa-se o seguinte:
 - Produção em ambiente protegido;
 - Laudo laboratorial para ausência de *Xcv*.

A verificação da ocorrência da doença no parreiral nos estágios iniciais facilita o seu manejo. O parreiral deve ser mantido sem plantas invasoras visando eliminar possíveis hospedeiros alternativos do patógeno (Lima, 2002).

A poda de produção, cuja finalidade é assegurar a regularidade das colheitas em quantidade e qualidade, mantendo a planta em equilíbrio vegetativo, deve ser programada de modo a evitar que os estádios compreendidos entre brotação e chumbinho coincidam com o período de chuvas. Na Índia podas de cultivo a partir da segunda semana de outubro possibilitam um maior escape da doença nas áreas produtoras (Chand *et al.*, 1991). Outras medidas que devem ser consideradas no controle da doença são o desbaste e o raleio (Mariano, 2006).

3.5.2.2- Controle químico

Como citado anteriormente, o manejo da doença torna-se muito complexo devido a ausência de produtos registrados (Gava, 2006). Entretanto, recomenda-se a aplicação preventiva de compostos cúpricos (Malavolta Jr. *et al.*, 1999). Dessa forma, muitos ensaios com termoterapia de bacelos, indutores de resistência e antibióticos buscam alternativas de manejo da doença para as regiões produtoras (Lopes, 2006).

Na região do Vale do São Francisco (Pólo Petrolina – Juazeiro) recomenda-se a aplicação de vários produtos fungicidas/bactericidas (**Quadro 2**), tais como: Kasumin, combinação de Manzate + oxiclreto de cobre, Cuprozeb e combinação de Midas + Kocide. Vale ressaltar ainda que esses produtos não são utilizados exclusivamente no controle do cancro bacteriano. Os produtores visam controlar doenças fúngicas, como o oídio, o que indiretamente auxilia no controle do cancro bacteriano (comunicação pessoal).

Quadro 2. Produtos químicos mais utilizados em videira no Vale do São Francisco (comunicação pessoal).

Produto	Composição	Classe	Grupo químico
Kocide*	Hidróxido de cobre	Fungicida/bactericida	Cúprico
Hokko Kasumin	Cloridrato de Kasugamicina	Fungicida/ Bactericida	Antibiótico
Manzate	Mancozeb	Fungicida	Ditiocarbamato
Cuprozeb	Oxicloreto de cobre + Mancozeb	Fungicida	Cúprico e ditiocarbamato
Midas	Famoxadone + mancozeb	Fungicida	Oxazolidinedionas e ditiocarbamato

*Dados referentes aos produtos, fonte: Andrei (2005).

3.5.2.3- Controle genético

A utilização de variedades resistentes é ainda um dos métodos mais eficientes para controle de fitobacterioses. Chand (1992), buscando fontes de resistência genética em videiras a *Xcv*, testou 14 espécies de *Vitis*; espécies de sete gêneros pertencentes à família Vitaceae e 73 cultivares de *V. vinifera* e *V. labrusca* em condições de infecção natural e inoculação artificial. *V. vinifera* se mostrou altamente susceptível, enquanto outros gêneros, tais como, *Ampelocissus* sp., *Ampelopsis* sp., *Cissus* sp. e *Leea* sp. e algumas espécies de *Vitis* como *V. champini*, *V. rupestris*, *V. candidans* e *V. cinerea* foram altamente resistentes. Cultivares sem sementes de *V. vinifera* foram mais suscetíveis quando comparados a cultivares com sementes.

Na avaliação de genótipos de videira quanto à resistência a *Xcv*, Aguiar *et al.* (2001) observaram que dentre as variedades testadas, as que apresentaram menor índice de infecção foram *V. shuttleworthii*, Seyne Villard e *V. Jacquemonti*.

Malavolta Jr. *et al.* (2003) avaliaram a reação de variedades de videira pertencentes às espécies *Vitis vinifera* e *V. labrusca* x *V. vinifera* (híbrido) a *Xcv*, por meio de inoculações artificiais. As avaliações foram realizadas através de escala de notas variando de 0 a 4, trinta dias após a inoculação, e mostraram que as variedades avaliadas diferiram quanto ao grau de resistência à bactéria. Os híbridos de *V. labrusca* x *V. vinifera* (Niagara Branca e Niagara Rosada) destacaram-se pelos baixos índices de severidade de doença apresentados e as variedades de *V. vinifera* (Red Globe, Benitaka, Rubi e Itália) mostraram os maiores índices de severidade de doença. Em valores absolutos, o maior índice de severidade foi apresentado pela variedade Red Globe. Mesmo sendo as variedades de *V. vinifera* as mais suscetíveis a esse patógeno, os resultados mostraram que esse patógeno também pode infectar os híbridos de *V. labrusca* x *V. vinifera*.

A Instrução Normativa nº 09, de 20 de abril de 2006, informa sobre os graus de suscetibilidade para *Xcv* nas diferentes variedades de videira (**Quadro 3**).

Quadro 3. Graus de suscetibilidade de variedades e cultivares de videira a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola**.

Cultivares	Grau de suscetibilidade
Red Globe	alto
Thompson	médio
Benitaka	médio
Festival	médio
Sonaka	médio
Itália	médio
Rubi	médio
Niagara Rosa	baixo
Niagara Branca	baixo
Princês	baixo

*Fonte: Instrução Normativa nº 09, de 20 de abril de 2006

OBJETIVOS

O cancro bacteriano é hoje uma das doenças mais importantes para a viticultura no Brasil. Desde 1998, o Laboratório de Fitopatologia da UnB tem mantido uma Coleção de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, visando sua caracterização e o monitoramento da sua variabilidade na região ao longo do tempo. Desta forma, buscando maior conhecimento sobre variabilidade do patógeno e seu comportamento quanto a tolerância aos cúpricos, produtos que vem sendo amplamente empregados no controle da doença, foram objetivos deste trabalho:

(1) Caracterizar a diversidade genética de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* coletados entre os anos de 2003 e 2006, comparando-os aos isolados já caracterizados, coletados entre 1998 e 2001.

(2) Determinar níveis de tolerância ao cobre em isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* representativos de diferentes épocas, de 1998 a 2006 e áreas de coleta.

(3) Detectar e caracterizar, em *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, a presença de regiões homólogas ao gene *copA* que confere resistência ao cobre em *Xanthomonas* spp.

CAPÍTULO 2

VARIABILIDADE MOLECULAR EM *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *VITICOLA*

1- INTRODUÇÃO

No Brasil observa-se um grande crescimento da viticultura e expansão da fronteira agrícola para novas áreas, tais como a região do Vale do São Francisco, que já se destaca atualmente como pólo produtor da viticultura tropical (Freire & Oliveira, 2001; Camargo, 2003).

Com a expansão da produção de uvas aumenta também a importância das doenças que ocorrem nessa cultura. Dentre as várias doenças, o cancro bacteriano causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Xcv), tem se destacado tanto pelos prejuízos causados quanto por sua distribuição, restrita a somente algumas regiões produtoras no nordeste brasileiro.

A publicação da estrutura do DNA é considerada como umas das sete maiores descobertas científicas da História. A partir de então técnicas avançadas foram desenvolvidas, compondo o que é conhecido hoje como a Biotecnologia Moderna. A cultura da videira, assim como muitas outras culturas, beneficiaram-se das tecnologias surgidas com esta descoberta e atualmente experimenta o estágio de investigação em escala genômica (Ravers, 2003).

Com o advento da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), descrita por Saiki *et al.* (1988), que utiliza a amplificação enzimática *in vitro* direcionada por “primers” na síntese de milhões de cópias de uma seqüência nucleotídica (Batista, 1993), foi possível o desenvolvimento de muitas ferramentas, entre elas os marcadores moleculares, possibilitando a caracterização, facilitando a pesquisa na avaliação da diversidade genética de populações de microrganismos (Louws *et al.*, 1999).

As tecnologias de análise molecular da variabilidade do DNA permitem determinar pontos de referência nos cromossomos, tecnicamente denominados de marcadores. Um

marcador é todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso. Diversas técnicas de biologia molecular estão disponíveis hoje para a detecção de variabilidade genética ao nível de seqüência de DNA, ou seja, para a detecção de polimorfismo genético (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Dessa forma a diversidade de grandes populações pode ser avaliada de maneira relativamente eficiente utilizando marcadores. Segundo Louws *et al.* (1999) a diversidade se refere ao grau de variação genética dentro de populações bacterianas. Os estudos de diversidade baseada em PCR são geralmente realizados com “primers” universais que geram “fingerprints” (impressões digitais). Três protocolos têm sido comumente empregados para “fingerprints” em fitobactérias: “primers” arbitrários ou randômicos que amplificam regiões polimórficas do DNA (AP-PCR e RAPDs – Random Amplified Polymorphic DNA) (Louws *et al.*, 1999), e baseados em seqüências repetitivas (rep-PCR) (Versalovic *et al.*, 1991).

Os estudos de homologia de DNA e o sequenciamento do DNA ribossomal formam a base para diferenciação e classificação de bactérias ao nível de espécie. Entretanto, a análise da seqüência 16S RNA mostra variabilidade limitada e não tem resolução suficiente para diferenciamento de todas espécies. Em contrapartida, a alta correlação entre estudos de homologia de DNA-DNA, rep-PCR e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) sugere que estes métodos podem ser considerados como uma ferramenta na sistemática bacteriana (Rademaker *et al.*, 2005).

A análise de rep-PCR foi desenvolvida com base na ocorrência de seqüências repetitivas conservadas denominadas: REP (Repetitive Extragenic Palindromic), ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus), e elementos BOX, distribuídas ao longo do genoma de diversas bactérias. Os protocolos são chamados de REP, ERIC e BOX-PCR, respectivamente, e rep-PCR em geral (Louws *et al.*, 1994).

Essas regiões conservadas estão amplamente distribuídas em isolados fitopatogênicos de *Xanthomonas* e *Pseudomonas*. Utilizando os “primers” REP, ERIC e BOX em isolados pertencentes a esses gêneros, Louws *et al.* (1994) observaram que a distribuição dessas seqüências reflete sua estrutura genômica, além de ser uma técnica simples e reprodutível na identificação e classificação de isolados desses gêneros. De Bruijn *et al.* (1996) consideram rep-PCR um método simples e altamente reprodutível na distinção

de isolados relacionados, na dedução de relações filogenéticas e nos estudos da diversidade em uma variedade de ecossistemas.

As possíveis funções destas seqüências ainda são discutidas, entretanto algumas podem ser consideradas, tais como: degradação do RNA mensageiro (estabilização), estrutura cromossômica, recombinação (Stern *et al.*, 1984) e regulação da expressão gênica (Higgins *et al.*, 1982). Outros estudos sugerem que estas seqüências estão também envolvidas na ligação de proteínas específicas da DNA polimerase I (Gilson *et al.*, 1990) e DNA girase (Yang & Ames, 1988). Entretanto, como citado anteriormente a função real destes elementos repetitivos ainda é um enigma (Rademaker *et al.*, 2005).

As seqüências nucleotídicas conservadas chamadas de REP foram descritas pela primeira vez em *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* (Higgins *et al.*, 1982) ocupando até 1 % de seus genomas (Stern *et al.*, 1984). Também são referidas como PUs (Palindromic Units) (Gilson *et al.*, 1990). Estas seqüências possuem mais ou menos 35 nucleotídeos, na região central uma inversão repetida e podem ocorrer isoladamente ou em múltiplas cópias adjacentes (Stern *et al.*, 1984).

A segunda família de elementos conservados ERIC, também conhecidas por Intergenic Repeat Units (IRUs), também foram descritas inicialmente em regiões intergênicas dos cromossomos de *E. coli* e *S. typhimurium*, entre outras espécies (Sharples & Lloyd, 1990). Apresenta uma seqüência de 126 pb e também uma seqüência central invertida, além de características semelhantes ao REP, apesar de a seqüência nucleotídica ser completamente diferente. Sua localização é variável entre as espécies (Hulton *et al.*, 1991). A função específica dessas seqüências ainda é discutida (Hulton *et al.*, 1991; Sharples & Lloyd, 1990).

Os elementos BOX consistem de várias combinações de três subunidades: BOX A, BOX B e BOX C, com 59, 45 e 50 nucleotídeos, respectivamente, e foram descritos primeiramente em *Streptococcus pneumoniae* (Martin *et al.*, 1992). Estudos realizados por Koeuth *et al.* (1995) indicam que a subunidade BOX A parece ser conservada em muitas espécies bacterianas, demonstrando a utilidade dessas seqüências repetitivas no estudo em microrganismos. Podem estar relacionados com processos de transformação ou virulência, ou seja, como elementos regulatórios em *S. pneumoniae* (Martin *et al.*, 1992).

A aplicação do rep-PCR como uma ferramenta exclusiva na definição de espécies não é aconselhável. Em contrapartida, os dados gerados pela técnica de rep-PCR permitem uma avaliação detalhada da diversidade genética a níveis sub-específicos. Com isso podem ser gerados bancos de dados de padrões genômicos que podem ser utilizados para comparação (Rademaker *et al.*, 2005).

Como rep-PCR é um método utilizado na distinção de isolados relacionados, na dedução de relações filogenéticas e no estudo da diversidade genética, muitos trabalhos reportam essa utilidade em vários gêneros e espécies bacterianas, tais como: na identificação e classificação de isolados de *Rhizobium meliloti* e outras bactérias de solo (De Bruijn, 1992); na diferenciação de isolados relacionados de *Bradyrhizobium japonicum* (Judd *et al.*, 1993); na identificação e classificação de isolados de *Xanthomonas* e *Pseudomonas* (Louws *et al.*, 1994); na análise da diversidade genética de *Ralstonia solanacearum* (Horita & Tsuchiya, 2000); e na diferenciação de fontes humanas e animais de contaminação fecal com *E. coli* (Dombek *et al.*, 2000).

Visando confirmar e refinar o esquema de classificação atual de *X. translucens* e identificar novos isolados de aspargo ornamental, Rademaker *et al.* (2006) utilizaram perfis de rep-PCR. Os perfis gerados foram comparados com perfis de um banco de dados englobando vários outros patovares. Este estudo facilitou a caracterização e diferenciação dos isolados de aspargos como *X. translucens* pv. *undulosa*, além da redefinição de várias outras patovares.

Ainda no gênero *Xanthomonas*, Kaur *et al.* (2005) utilizou rep-PCR, entre outras técnicas, para elucidar a estrutura populacional e o relacionamento intrapatovar de isolados bacterianos de diferentes partes da Índia de *X. axonopodis* pv. *cyamopsidis*, agente causal da ferrugem em feijão de corda. Em seus estudos puderam observar uma variação tanto na patogenicidade quanto na estrutura genética da população, sendo que o alto grau de variação genética revelado pelos marcadores deve ser considerado na procura por fontes de resistência. Além disso, nenhuma correlação pode ser observada com respeito a área de coleta, sugerindo que o patógeno foi difundido por meio de germoplasma contaminado.

Isolados de *Xanthomonas* de alho foram caracterizados por Gent *et al.* (2004) utilizando várias técnicas, incluindo rep-PCR. Os perfis genômicos gerados pela técnica

foram altamente conservados e representaram uma forte ferramenta na investigação da disseminação de *X. axonopodis* pv. *allii* por sementes entre diferentes regiões produtoras.

A diversidade genética de *X. campestris* pv. *vitians* foi avaliada com várias técnicas, entre elas a de rep-PCR por Barak & Gilbertson (2003). A análise com o marcador mostrou que a população estudada foi homogênea, e que pode ser distinguida de outras patovares.

Visando comparar técnicas de “fingerprints” genômicos, como AFLP e rep-PCR, com estudos de homologia de DNA-DNA no gênero *Xanthomonas*, Rademaker *et al.* (2000) observaram uma alta correlação entre as diferentes técnicas de “fingerprints”, uma vez que revelaram uma alta correlação filogenética e genotípica dos organismos. Com isso esses padrões podem ser utilizados na determinação da diversidade e na estrutura filogenética das populações bacterianas.

Em *X. fragariae*, rep-PCR também foi útil na identificação de isolados de campo, sendo considerado uma ferramenta no desenvolvimento de métodos de detecção a ser utilizado na produção de mudas de morango livres da doença (Opgenorth *et al.*, 1996).

Para isolados de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, rep-PCR foi utilizada por Louws *et al.* (1995). A técnica permitiu identificar quatro genótipos distintos em meio a isolados não identificados dessa patovar.

Uma caracterização molecular de 41 isolados de *X. campestris* pv. *viticola*, coletados entre 1998 e 2001, foi realizada por Trindade *et al.* (2005) e estes foram comparados através da análise combinada dos padrões obtidos com os “primers” REP, ERIC e BOX. Observou-se alta similaridade entre a maioria dos isolados de *Xcv* e foi possível distinguí-los de isolados de outras patovares de *Xanthomonas*. O polimorfismo observado com a técnica permitiu a diferenciação de cinco subgrupos entre os isolados brasileiros, sem nenhuma correlação com a cultivar de origem, local ou época de coleta.

Além do rep-PCR, outra técnica que pode ser empregada na identificação de isolados e caracterização da diversidade genética em fitobactérias é o ITS-PCR, que consiste na utilização de “primers” conservados dos genes ribossomais 16S e 23S para amplificar os espaços transcritos internos (Jensen *et al.*, 1993). A região ITS entre os genes 16S e 23S do rRNA pode incluir vários genes do tRNA e regiões não codificadas (Louws *et al.*, 1999).

Para a definição genômica de espécies e estudos de diversidade genética, utiliza-se a amplificação por PCR (ITS-PCR) e posterior restrição com endonucleases (RFLP –

Restriction Fragment Length Polymorphism). A técnica de RFLP faz uso de enzimas de restrição para fragmentar o DNA (Batista, 1993). As enzimas de restrição também chamadas de endonucleases de restrição, reconhecem uma seqüência de bases específica na dupla hélice de DNA e cortam ambas as fitas, em sítios determinados.

A utilização de análises do rDNA amplificado aliadas à análise de restrição tem sido relatada em vários trabalhos. O relacionamento filogenético entre 77 isolados bacterianos de *Pseudomonas syringae* e *Pseudomonas viridiflava* foi avaliada por RFLP dos genes *rrs* e *rriI* e da região ITS1. A técnica de ITS-RFLP permitiu observar que *P. syringae* pv. *tomato* formam um grupo homogêneo que é filogeneticamente distinto de outras patovares e da espécie *P. viridiflava* (Manceau & Horvais, 1996).

OBJETIVOS

Considerando a ocorrência do cancro bacteriano da videira no Brasil desde 1998, os prejuízos causados por esse patógeno e a importância em se monitorar a variabilidade das populações ao longo dos anos, foram objetivos deste trabalho:

- (1) Caracterizar, através da técnica de rep-PCR, 27 isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* coletados entre os anos de 2003 e 2006 e compará-los com isolados já caracterizados por Trindade *et al.* (2005).
- (2) Confirmar a variabilidade observada com o uso de outro marcador molecular, o ITS-RFLP.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Local e período de realização dos trabalhos

Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, de outubro de 2005 a março de 2007.

2.2- Isolados bacterianos

Os isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* foram obtidos de amostras de videira coletadas na região do Vale do São Francisco e/ou recebidas para análise no Laboratório de Fitopatologia – UnB. No presente estudo foram utilizados 27 isolados de videira (**Tabela 1**, isolados de 1 a 27). Outras 5 estirpes, da Coleção de Bactérias Fitopatogênicas do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília (**Tabela 1**, isolados de 29 a 33), foram selecionadas e incluídas, uma vez que se mostraram os mais divergentes em estudo de caracterização da variabilidade genética realizado anteriormente por Trindade *et al.* (2005). A estirpe tipo (NCPBB 2475), originária da Índia, obtida junto à National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Central Science Laboratory (Sand Hutton, York, Reino Unido, import permit nº05227) também foi incluída neste estudo, totalizando 33 isolados bacterianos.

Tabela 1. Designação, origem e ano de coleta dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* utilizados neste estudo.

Designação		Origem		Ano de Coleta
		Cultivar	Local de coleta	
1	UnB 1292	cv.Red Globe	Projeto Mandacaru, Juazeiro – BA	2003
2	UnB 1293	cv.Superior x IAC 766	Faz. Vale das Uvas – PE	2003
3	UnB 1294	cv.Thompson x Paulsen	Faz. Boa Esperança, Petrolina – PE	2003
4	UnB 1295	cv.Festival	Projeto Bebedouro, Petrolina – PE	2004
5	UnB 1296	cv.Itália	PISNC, Petrolina – PE	2004
6	UnB 1297	cv.Festival	PISNC, Petrolina – PE	2004
7	UnB 1298	cv.Itália	Faz. Mariad, Petrolina – PE	2004
8	UnB 1299	cv.Thompson	Faz. DAN, Petrolina – PE	2004
9	UnB 1300	cv.Festival	Faz. Frutirenda, Petrolina – PE	2004
10	UnB 1301	cv.Thompson	Petrolina – PE	2004
11	UnB 1302	cv.Thompson	Petrolina – PE	2004
12	UnB 1303	cv.Festival	Faz. Frutirenda, Petrolina – PE	2005
13	UnB 1304	cv.Festival	Faz. Frutirenda, Petrolina – PE	2005
14	UnB 1305	cv.Festival	Faz. Frutirenda, Petrolina – PE	2005
15	UnB 1306	cv.Festival	Faz. Frutirenda, Petrolina – PE	2005
16	UnB 1307	cv.Festival	Faz. Frutirenda, Petrolina – PE	2005
17	UnB 1308	cv.Festival	Faz. Frutirenda, Petrolina – PE	2005
18	UnB 1309	cv.Festival	Faz. Frutirenda, Petrolina – PE	2005
19	UnB 1310	cv.Festival	Faz. Frutirenda, Petrolina – PE	2005
20	UnB 1311	cv.Festival	Faz. Frutirenda, Petrolina – PE	2005
21	UnB 1312	cv.Festival	Faz. Frutirenda, Petrolina – PE	2005
22	UnB 1313	cv.Festival	Faz. Frutirenda, Petrolina – PE	2005
23	UnB 1314	cv.Red Globe	Faz. Boa Esperança, Petrolina – PE	2005
24	UnB 1315	cv.Red Globe	Faz. Boa Esperança, Petrolina – PE	2005
25	UnB 1316	cv.Red Globe	Faz. PECEL, Petrolina – PE	2005
26	UnB 1317	cv.Festival	Petrolina – PE	2005
27	UnB 1318	cv.BRS – Morena	Caldas – MG	2006
28	UnB 1183	cv.Red Globe	Faz. Vale das Uvas – PE	1998
29	UnB 1204	cv.Red Globe	Projeto Maniçoba, Juazeiro – BA	1999
30	UnB 1212	cv.Itália	Projeto Senador Nilo Coelho – PE	2001
31	UnB 1222	cv.Perlette	Projeto Bebedouro– PE	2001
32	UnB 1227	cv.Red Globe	Projeto Senador Nilo Coelho – PE	2001
33	NCPPB 2475	cv.Anab-e-Shahi	Índia	1972

2.3- Cultivo e preservação dos isolados

Nas repicagens de rotina e preparo de inóculo para realização dos testes bioquímicos e moleculares foi utilizado o meio 523 modificado de Kado & Heskett (1970). Os isolados foram preservados em água estéril, mantidos a temperatura ambiente e em glicerol a 30 %, congelados a -80°C .

2.4- Caracterização bioquímica de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*

Testes bioquímicos foram realizados com a finalidade de confirmar a identidade dos 27 isolados bacterianos oriundos de amostras coletadas ou recebidas para análise. A partir do isolamento em meio de cultura sólido e caracterização cultural, os isolados que apresentaram colônias convexas, brilhantes, lisas e de cor creme-esbranquiçada foram repicadas e submetidos aos seguintes testes: teste KOH (alternativo ao teste de Gram); oxidação/fermentação da glicose; fluorescência em meio King's B; utilização de asparagina como fonte única de carbono e nitrogênio; crescimento em meio TTC (cloreto de trifetil tetrazólio) a 0,1 % e atividade da catalase. Os testes e meios de cultura (**Anexo**) foram utilizados de acordo com os protocolos convencionais descritos por Schaad *et al.* (1994); Lelliot & Stead (1987); Hugh & Leifson (1953); Starr & Weiss (1943) e Lozano & Sequeira (1970).

2.5- Reação de hipersensibilidade em plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv. Santa Cruz)

Uma suspensão, equivalente a Escala 7 de MacFarland (aproximadamente 10^9 ufc/ml) foi preparada a partir de uma cultura bacteriana de 48 h. As suspensões foram infiltradas sobre a epiderme, no espaço internerval da face inferior da folha de tomate. Para isso procedeu-se pressionando a seringa com a suspensão até a obtenção de uma área encharcada de aproximadamente 1cm de diâmetro. A reação foi observada até o quarto dia após a

infiltração. Como padrões positivos foram utilizados os isolados *X. campestris* pv. *campestris* (UnB 159), *Xcv* (UnB 1183) e como controle negativo, água destilada estéril.

2.6- Caracterização molecular de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*

2.6.1- Extração de DNA genômico

Para a extração do DNA total do genoma bacteriano utilizou-se o protocolo modificado de Ausubel *et al.* (1992). Inicialmente os isolados bacterianos foram cultivados em 10 ml de meio 523 líquido (Modificado de Kado & Heskett, 1970) por 20 h, a 28 °C. Em seguida 1,5 µl desse cultivo foi transferido para tubos “Eppendorf” e centrifugados a 8.000 rpm (4600 x g) em microcentrífuga (Labnet Force 7 – National labnet Company, Inc.), por 5 min. Os precipitados foram ressuspensos em 520 µl de tampão TE: 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA. Em seguida adicionou-se 25 µl de SDS 20 %, 3 µl de Proteinase K (20 mg/ml) e incubou-se a 37 °C por 1 h. Posteriormente adicionou-se 100 µl de NaCl 5 M e 80 µl de CTAB/NaCl (CTAB 10 % em NaCl 0,7 M). Incubou-se no gelo por 14 min. Adicionou-se 1 volume de clorofórmio: álcool isoamil (24:1), o equivalente a aproximadamente 720 µl. As amostras foram novamente incubadas no gelo por 5 min e centrifugadas a 10.000 rpm (7200 x g), por 20 min. Após a centrifugação transferiu-se os sobrenadantes para novos tubos; e novamente adicionou-se igual volume de clorofórmio: álcool isoamil (24:1), repetindo-se o mesmo procedimento anterior. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde se adicionou 0,6 do volume de isopropanol, seguido de incubação por cerca de 16 h, a –20 °C. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 10.000 rpm (7200 x g). Os precipitados foram lavados duas vezes em 500 µl de etanol 70 % e centrifugados a 10.000 rpm (7200 x g) por 5 min. Na última etapa descartou-se o sobrenadante e retirou-se cuidadosamente o líquido restante. Os tubos foram secos em estufa a 37 °C, durante 30 min e os ácidos nucléicos precipitados foram ressuspensos em 25 µl de TE e armazenados, a –20 °C.

2.6.2- Quantificação do DNA genômico

A quantificação foi realizada com base na análise comparativa da intensidade das bandas das amostras com o marcador High DNA Mass Ladder (GIBCO – BRL), por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8 % preparado em tampão 0,5 X TBE (5,4 g de Tris-base, 2,75 g de ácido bórico e 0,375 g de EDTA para 1000 ml), onde 5 µl do DNA genômico foram misturados a 1 µl do tampão de carregamento 10 X (50 % de glicerol, 1 mM EDTA; 0,4 % Bromophenol blue e 0,4 % de Xylene cyanol). As amostras foram submetidas a uma corrente de 80 V por 1 h, seguido da coloração com brometo de etídio (0,5 µg/ml), descoloração em água destilada e posterior fotodocumentação em Eagle EYE™ – II (Stratagene®). Após a quantificação foram preparadas alíquotas de trabalho em uma concentração final de 10 ng/µl de DNA.

2.6.3- Identificação com iniciadores (“primers”) específicos

A fim de confirmar a identidade dos isolados bacterianos em estudo utilizou-se PCR (Reação em cadeia da polimerase) com iniciadores (“primers”) específicos (Xcv1F – Xcv3R) (**Tabela 2**) para amplificação de um fragmento de 240 pb do gene *hrpB* de *Xcv* (Trindade *et al.*, 2005; Trindade *et al.*, 2007).

Para as reações de amplificação foram utilizados: tampão *Taq* 1 X (20 mM Tris HCl, pH 8,4; 50 mM de KCl); 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 mM de cada um dos dNTP's (GIBCO – BRL); 25 µmol de cada “primer”; 1,25 U de *Taq* DNA polimerase (GIBCO – BRL); 0,4 ng de DNA por µl de reação e água milliQ para um volume final de 25 µl.

Tabela 2. Seqüências dos “primers” desenhados para a região correspondente ao gene *hrpB* de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Trindade *et al.*, 2007).

Região alvo	“Primer”	Seqüência 5' → 3'	Nº de nucleotídeos
<i>hrpB</i>	Xcv1F	TGCAGGTGAGCTGTGC	16
	Xcv3R	AGTTCGACCACCTTGCCATA	20

As amostras foram submetidas à amplificação em termociclador RoboCycler96 (Stratagene®), sendo inicialmente aquecidas a 95 °C por 2 min, posteriormente submetidas a 35 ciclos de 95 °C por 1 min para desnaturação, 1 min a 64 °C para o anelamento dos “primers” e 72 °C por 2 min para extensão e extensão final a 72 °C por 10 min.

Os produtos da amplificação por PCR foram analisados em gel de agarose a 1 %, preparado em tampão 0,5 X TBE, onde 12 µl de cada amostra foram misturados a 1 µl de tampão de carregamento 10 X e aplicados ao gel. A eletroforese foi realizada a 85 V durante 50 min. Após a corrida, o gel foi corado, descorado e fotografado. O marcador utilizado foi o 100 pb DNA – Ladder (Promega).

2.6.4- rep-PCR

Para as reações de rep-PCR com os “primers” (**Tabela 3**) correspondentes às seqüências REP, ERIC e BOX, foram utilizados: tampão *Taq* 1 X (50 mM KCl, 20 mM Tris HCl); 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 mM de cada um dos dNTPs (GIBCO – BRL); 25 µmol de cada primer; 1,25 U de *Taq* DNA polimerase (GIBICO – BRL); 1,2 ng de DNA por µl de reação e água milliQ para um volume final de 25 µl.

As amostras foram submetidas à amplificação em termociclador RoboCycler96 (Stratagene®), sendo inicialmente aquecidas a 95 °C por 7 min, e posteriormente submetidas a 35 ciclos de 94 °C por 1 min para desnaturação, 8 min a 44 °C para anelamento dos “primers” (REP1R – I e REP2 – I) e 15 min a 65 °C para a extensão. Para ERIC e BOX-PCR as amostras foram submetidas ao seguinte programa: 95 °C por 7 min, 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 8 min a 52 °C (ERIC) e 53 °C (BOX), e 15 min a 65 °C. Para o término da extensão pela *Taq* DNA polimerase, após os ciclos, a temperatura foi mantida a 65 °C por 15 min. As reações foram realizadas em duplicata para cada isolado.

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5 %. A eletroforese foi realizada a 75 V durante 4 h e 30 min. Após a corrida, o gel foi corado, descorado e fotografado, conforme já descrito anteriormente. O marcador utilizado foi o de 100 pb DNA – Ladder (GIBCO – BRL).

Tabela 3. Descrição dos “primers” utilizados para rep-PCR (Louws *et al.*, 1994).

Seqüência alvo	“Primers”	Seqüência dos “primers” (5’ → 3’)
REP	REP1R-I	IIICGICGICATCIGGC
	REP2-I	ICGITTATCIGGCCTAC
ERIC	ERIC1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTCA
	ERIC2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG
BOX	BOXA1R	CTCCGGCAAGGCGACGCTGAC

Os perfis de amplificação com REP, ERIC e BOX-PCR dos 33 isolados bacterianos foram analisados visualmente de acordo com a presença (1) e ausência (0) de bandas, independente da intensidade, separada e conjuntamente por meio do programa MVSP 3.1 (Multi-Variate Statistical Package, Version 3.11h/1985-2000 Kovach Computing Services). Os relacionamentos genéticos entre os isolados foram determinados pelos coeficientes de similaridade de Jaccard e análise de agrupamento de acordo com o método UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages) (Dias, 1998).

2.6.5- ITS-RFLP

2.6.5.1- Amplificação da região ITS

Para a amplificação da região intergênica 16S – 23S rRNA foram usados os “primers” L1 (Jensen *et al.*, 1993) e C1 (Maes *et al.*, 1996) (**Tabela 4**), que amplificam um fragmento em torno de 600 pb.

Tabela 4. Descrição dos “primers” utilizados na amplificação da região intergênica (16S – 23) do DNA ribossomal.

“Primer”	Seqüência (5’ → 3’)
C1	AGT AGT AAC AAG GTA ACC
L1	CCA GGC ATC CAC CGT

Cada reação foi composta de 0,2 mM de cada um dos dNTPs; 1,5 mM de MgCl₂; tampão da enzima 1 X (20 mM Tris HCL, pH 8.4; 50 mM de KCL); 25 µmol de cada “primer”; 1,25 U de *Taq* DNA polimerase (GIBCO – BRL); 0,4 ng de DNA por reação e água milliQ, para um volume final de 25 µl. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador PT – 100TM (MJ Research, Watertown, Mass). A temperatura de desnaturação inicial foi de 95 °C por 4 min, seguida de 30 ciclos de: 95 °C por 1 min, 50 °C por 1 min e 72 °C por 2 min, com extensão final a 72 °C por 10 min.

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 1 %. A eletroforese foi realizada a 75 V durante 3 h e 30 min. Após a corrida, o gel foi corado, descorado e fotografado. O marcador utilizado foi o de 100 pb DNA – Ladder (GIBCO – BRL).

2.6.5.2- Digestão dos produtos de PCR

Os produtos de PCR obtidos com os primers C1 – L1 foram submetidos à análise de restrição com as endonucleases: *Hae*III (GIBCO – BRL) e *Msp*I (Pharmacia). Cada reação foi preparada com: 2 µl de tampão 10 X da enzima; 0,5 U da enzima de restrição por µl de reação ; 5 µl de DNA (produto de PCR) e água milliQ estéril, para um volume final de 20 µl. As amostras foram mantidas a 37 °C, por 16 h. Os produtos da digestão com as enzimas foram analisados em gel de poliácridamida 0,8 % (10 ml de TBE 5 X; 13,3 ml de acrilamida 30 %; 350 µl de persulfato de amônio; 20 µl de TEMED e 26,35 ml de água). A eletroforese foi realizada em TBE 1 X a 75 V durante 4 h e 30 min e os fragmentos de restrição

visualizados após coloração com brometo de etídio. O marcador utilizado foi o de 100 pb – Ladder (Promega). Os perfis de restrição gerados dos 33 isolados bacterianos foram analisados visualmente de acordo com a presença (1) e ausência (0) de bandas, assim como descrito anteriormente para rep-PCR.

3- RESULTADOS

3.1- Caracterização bioquímica

De acordo com os testes bioquímicos realizados (**Tabela 5**) observou-se que:

- ✓ Todos os 27 isolados apresentaram reação positiva solúvel no teste de KOH, ou seja, são Gram-negativos.
- ✓ Em relação ao teste O/F (oxidativo/fermentativo), todos apresentaram metabolismo oxidativo.
- ✓ A utilização de asparagina, como fonte única de carbono e nitrogênio, não foi observada para nenhum dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*.
- ✓ O teste de fluorescência em meio King's B mostrou ausência de pigmentos em todos os isolados.
- ✓ Foi observada atividade da catalase para todos os isolados.
- ✓ Todos os isolados testados tiveram seu crescimento inibido, exibindo dessa forma, tolerância ao sal de tetrazólio a 0,1 %.

O teste de hipersensibilidade (RH) em folhas de tomate Santa Cruz (**Figura 2**) foi positivo para todos os 27 isolados, com reação necrótica observada 24 h após a inoculação.

Dessa forma todos os 27 isolados apresentaram as características típicas do gênero *Xanthomonas* e condizentes com a descrição de *X. campestris* pv. *viticola* (Nayudu, 1972; Malavolta Jr. *et al.*, 1999; Lima *et al.*, 1999; Trindade *et al.*, 2005).

Tabela 5. Caracterização bioquímica e reação de hipersensibilidade, em folha de tomate, dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, procedentes de diferentes áreas e coletados entre 2003 e 2006.

	Isolado	Gram ^a	O/F	Asparagina	King's B ^b	Catalase	RH ^c
1	UnB 1292	+	O	-	-	+	+
2	UnB 1293	+	O	-	-	+	+
3	UnB 1294	+	O	-	-	+	+
4	UnB 1295	+	O	-	-	+	+
5	UnB 1296	+	O	-	-	+	+
6	UnB 1297	+	O	-	-	+	+
7	UnB 1298	+	O	-	-	+	+
8	UnB 1299	+	O	-	-	+	+
9	UnB 1300	+	O	-	-	+	+
10	UnB 1301	+	O	-	-	+	+
11	UnB 1302	+	O	-	-	+	+
12	UnB 1303	+	O	-	-	+	+
13	UnB 1304	+	O	-	-	+	+
14	UnB 1305	+	O	-	-	+	+
15	UnB 1306	+	O	-	-	+	+
16	UnB 1307	+	O	-	-	+	+
17	UnB 1308	+	O	-	-	+	+
18	UnB 1309	+	O	-	-	+	+
19	UnB 1310	+	O	-	-	+	+
20	UnB 1311	+	O	-	-	+	+
21	UnB 1312	+	O	-	-	+	+
22	UnB 1313	+	O	-	-	+	+
23	UnB 1314	+	O	-	-	+	+
24	UnB 1315	+	O	-	-	+	+
25	UnB 1316	+	O	-	-	+	+
26	UnB 1317	+	O	-	-	+	+
27	UnB 1318	+	O	-	-	+	+

^aReação de gram realizada pelo método de KOH

^bTeste de produção de pigmentos fluorescentes utilizando o meio de cultura B de King

^cRH: Reação de hipersensibilidade observada em folhas de tomate cv. Santa Cruz, 24 h após infiltração.

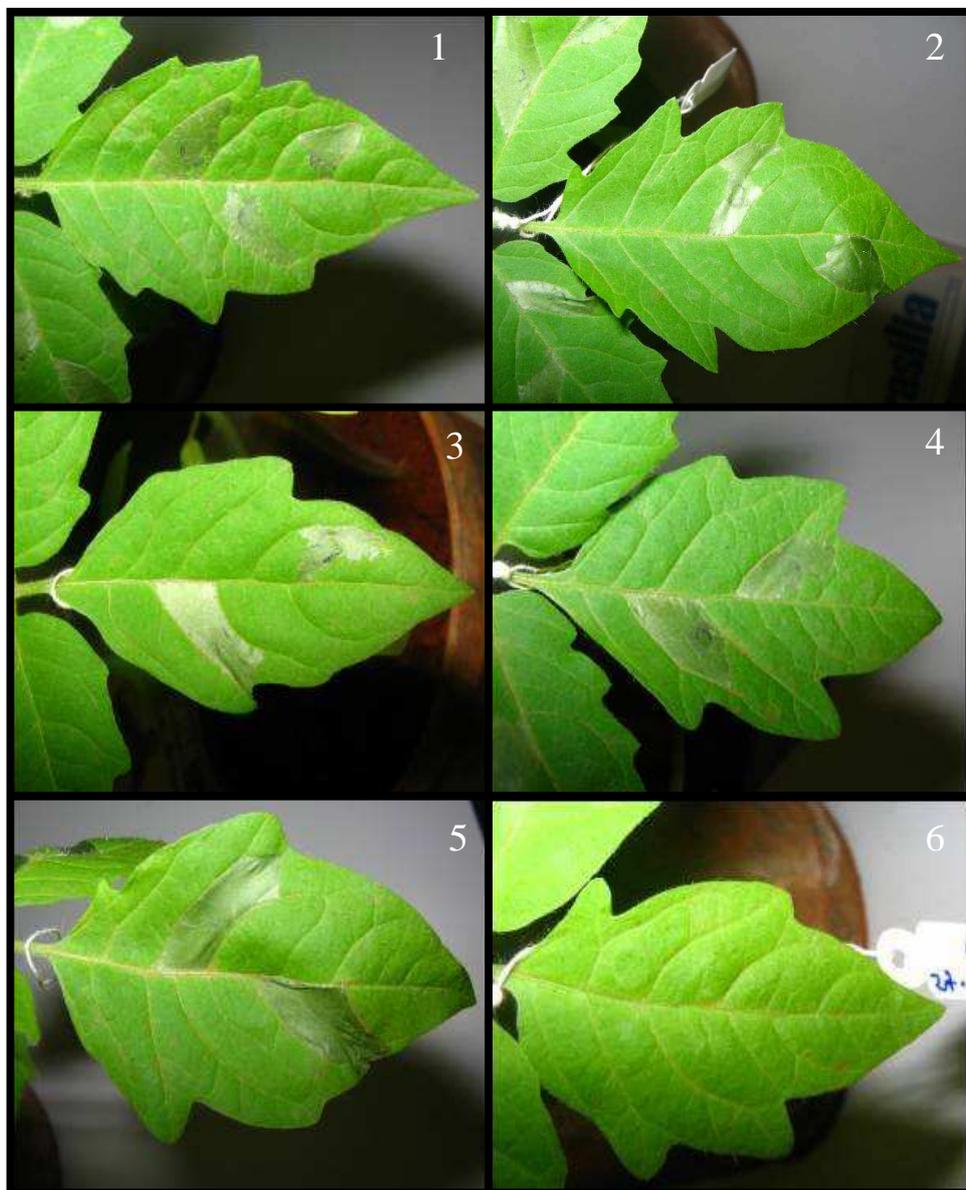


Figura 2. Reação de hipersensibilidade induzida por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em folhas de tomate, após 24 h da inoculação. (1) UnB 1293; (2) UnB 1299; (3) UnB 1309; (4) UnB 1318; (5) UnB 1183 e (6) Controle negativo (água destilada estéril).

3.2- Caracterização molecular

3.2.1- Identificação com iniciadores (“primers”) específicos

As ampliações a partir do DNA genômico purificado dos 33 isolados de *Xcv* com os oligonucleotídeos específicos (Xcv1F – Xcv3R), visualizadas em gel de agarose, resultaram em fragmentos de tamanho esperado de 240 pb (**Figura 3**). Os resultados obtidos concordam com os testes bioquímicos, confirmando a identidade dos isolados como *X. campestris* pv. *viticola*. O mesmo foi observado para o isolado tipo NCPPB 2475 cujo DNA foi utilizado como controle positivo do experimento.

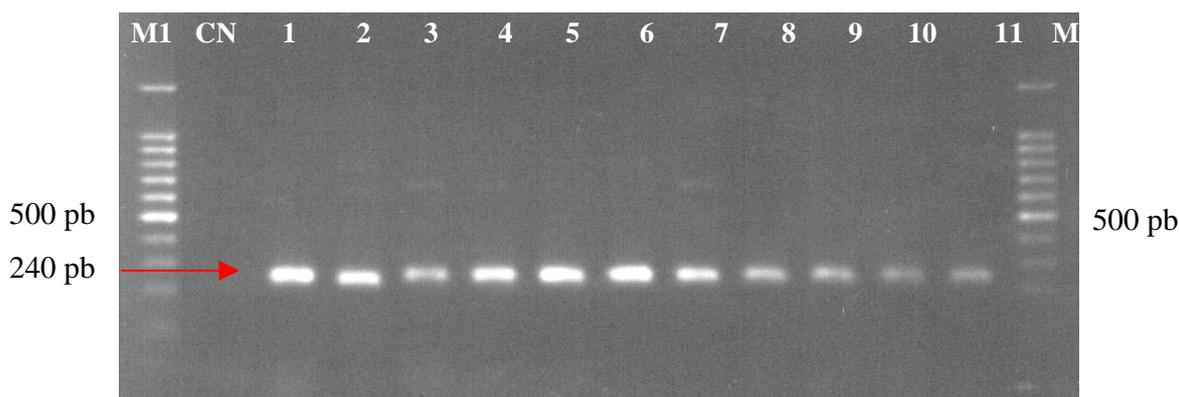


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 1 % do produto de PCR obtido com os “primers” Xcv1F – Xcv3R correspondente à região do “cluster” *hrpB* de diferentes isolados: CN: Controle Negativo (reação sem DNA); (1) NCPPB 2475; (2) UnB 1302; (3) UnB 1303; (4) UnB 1304; (5) UnB 1305; (6) UnB 1306; (7) UnB 1307; (8) UnB 1308; (9) UnB 1309; (10) UnB 1310; (11) UnB 1311. M1 e M2 – Marcador 100 pb DNA – Ladder (Promega).

3.2.2- rep-PCR

As ampliações do DNA purificado de *Xcv* com os “primers” REP, ERIC e BOX-PCR (rep-PCR) visualizadas em gel de agarose, geraram múltiplos produtos (um total de 39 bandas) com fragmentos variando de 170 a 2036 pb.

BOX-PCR

O “primer” BOXA 1R em PCR gerou 10 bandas variando de 190 a 2036 pb (**Figura 4**), estando a banda de aproximadamente 700 pb presente em todos os isolados de *Xcv* estudados. As bandas de 1100 e 800 pb também estiveram constantes em quase todos os isolados exceto para UnB 1212, UnB 1222 e UnB 1227. As bandas de 1700, 400 pb e 250 pb estiveram presentes somente nos isolados coletados entre 2003 e 2006 e também na estirpe tipo NCPPB 2475 da Índia, não sendo observada no restante das estirpes coletadas entre 1998 e 2001. O dendrograma (**Figura 5**) gerado para os isolados foi analisado em dois níveis, a 20 % e a 70 % de similaridade. Na primeira análise, a 20 % de similaridade, pode-se identificar dois grupos, A e B. O grupo A com estirpes UnB 1212, UnB 1222 e UnB 1227 todas de Pernambuco e o grupo B englobando a estirpe UnB 1204, da Bahia e todos os outros isolados de *Xcv*. A 70 % de similaridade pode-se dividir os isolados em 4 grupos. O grupo 4 com 29 isolados incluindo a estirpe tipo NCPPB 2475 da Índia e UnB 1183 de Pernambuco, que foram agrupados com 100 % de similaridade e todos os outros isolados coletados entre 2003 e 2006, em diferentes áreas da Bahia e Pernambuco, que formaram outro agrupamento com o mesmo nível de similaridade. A única exceção foi o isolado UnB 1317, mas apresentou similaridade superior a 84 %. As outras 4 estirpes foram agrupadas separadamente, exceto UnB 1212 e UnB 1222, ambas de Pernambuco, que formaram um grupo com mais de 70 % de similaridade entre si.

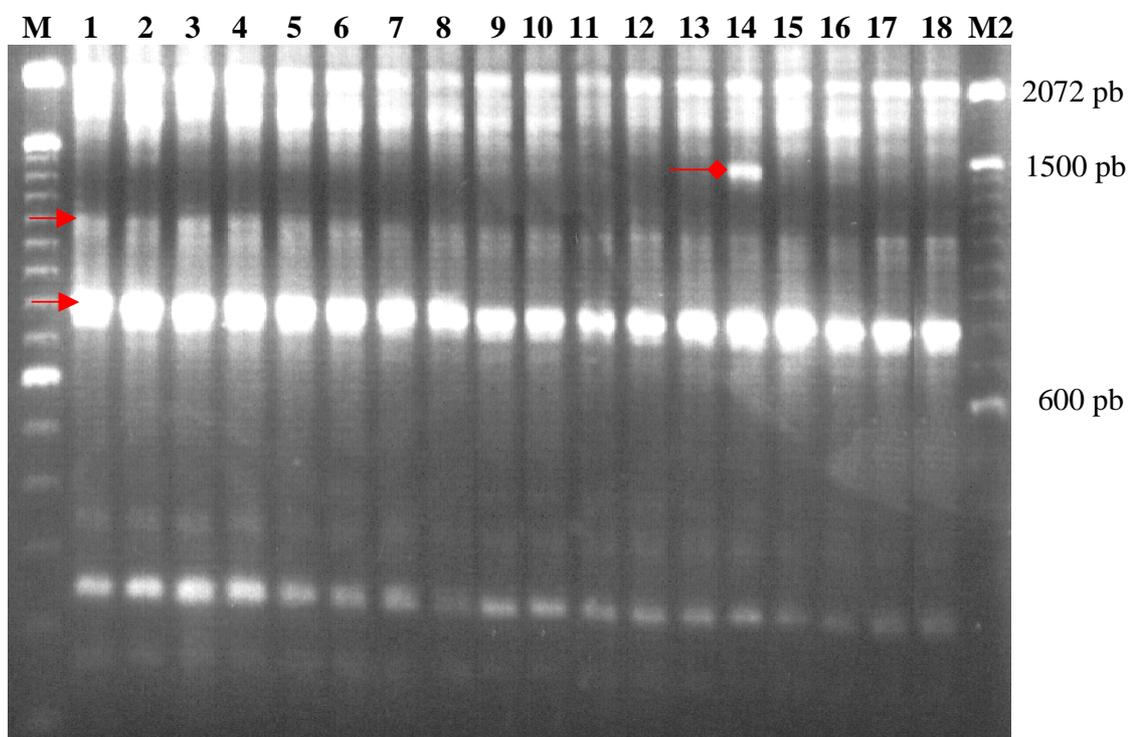


Figura 4. Análise eletroforética dos fragmentos gerados através de BOX-PCR, a partir de DNA purificado de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. (1) UnB 1301; (2) UnB 1302; (3) UnB 1303; (4) UnB 1304; (5) UnB 1305; (6) UnB 1306; (7) UnB 1307; (8) UnB 1308; (9) UnB 1309; (10) UnB 1310; (11) UnB 1311; (12) UnB 1312; (13) UnB 1313; (14) UnB 1314; (15) UnB 1315; (16) UnB 1316; (17) UnB 1317; (18) UnB 1318. M1 e M2- Marcador 100 pb DNA – Ladder (Gibco-BRL). As setas (→) indicam Bandas em comum para todos os isolados coletados entre os anos de 2003 e 2006. E Região polimórfica encontrada apenas em UnB 1315, entre os isolados coletados entre os 2003 e 2006 (→♦).

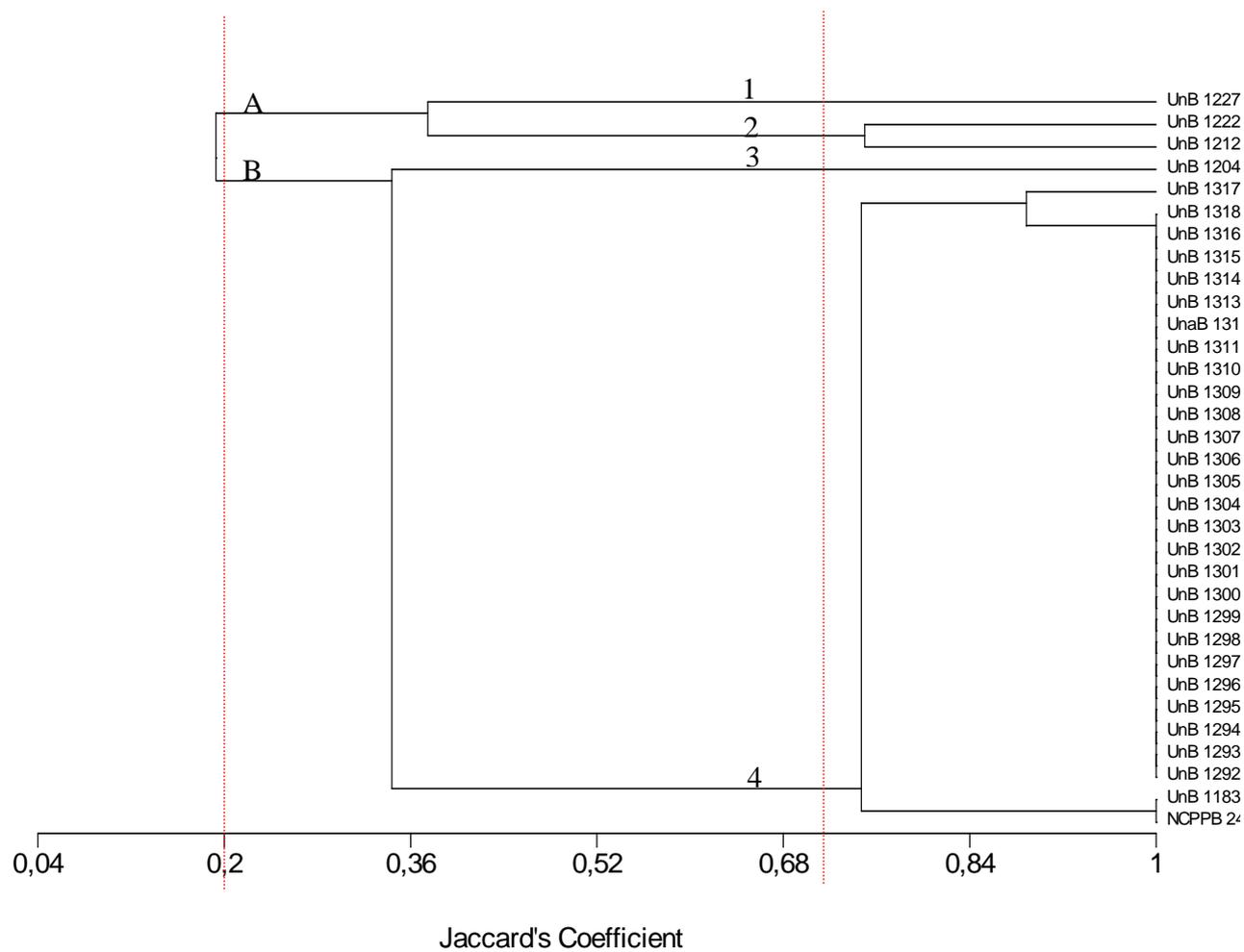


Figura 5. Dendrograma baseado no método UPGMA, de acordo com os perfis de amplificação gerada por BOX-PCR, mostrando as relações entre os isolados entre isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* de videira.

ERIC-PCR

A utilização dos primers ERIC (ERIC1R e ERIC2) gerou um total de 12 bandas variando entre 170 e 2000 pb (**Figura 6**). As bandas de 2000 e 270 pb estiveram presentes em quase todos os isolados exceto nas estirpes UnB 1212, UnB 1222 e UnB 1227. Da mesma forma as bandas de 800 e 600 pb que só não estiveram presentes nas estirpes UnB 1212 e UnB 1227, coletadas entre 1998 e 2001. A banda de 550 pb só esteve presente na estirpe UnB 1212 e a de 500 pb só nos isolados coletados entre 2003 e 2006. Os fragmentos de 400 e 170 pb estiveram presentes em todos os isolados exceto na estirpe UnB 1212.

O dendrograma (**Figura 7**) obtido com os “primers” ERIC possibilitou a análise em dois níveis. Inicialmente a 20 % de similaridade foram estabelecidos dois grupos: o grupo A composto somente pela estirpe UnB 1212 e o grupo B que englobou todos os outros isolados de *Xcv*. A 70 % de similaridade, 5 grupos foram evidentes. Os grupos 1, 2, 3 e 4 agruparam separadamente as estirpes UnB 1212, UnB 1227, UnB 1204 e UnB 1222 respectivamente. O grupo 5 inclui todos os outros isolados e a estirpe UnB 1183. A estirpe da Índia NCPPB 2475 formou um único agrupamento com a estirpe UnB 1183 de Pernambuco, com similaridade superior a 84 %. Dois outros grandes grupos foram formados com 100 % de similaridade, o primeiro englobando isolados da Bahia e Pernambuco e o segundo com isolados somente de Pernambuco. Ainda dentro do grupo 5, o isolado UnB 1301 de Pernambuco foi agrupado separadamente com similaridade superior a 84 %.

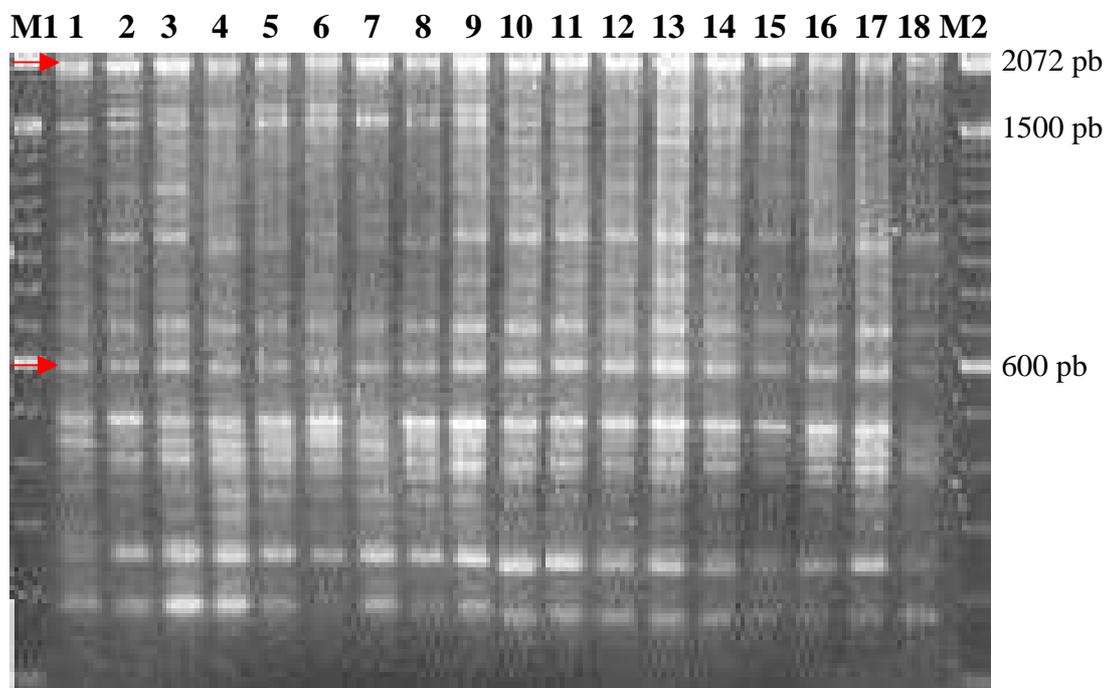


Figura 6. Análise eletroforética dos fragmentos gerados através de ERIC-PCR, a partir de DNA purificado de isolados utilizados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. (1) UnB 1301; (2) UnB 1302; (3) UnB 1303; (4) UnB 1304; (5) UnB 1305; (6) UnB 1306; (7) UnB 1307; (8) UnB 1308; (9) UnB 1309; (10) UnB 1310; (11) UnB 1311; (12) UnB 1312; (13) UnB 1313; (14) UnB 1314; (15) UnB 1315; (16) UnB 1316; (17) UnB 1317; (18) UnB 1318. M1 e M2- Marcador 100 pb DNA – Ladder (Gibco-BRL). As setas indicam bandas comuns em todos os isolados coletados entre os anos de 2003 e 2006.

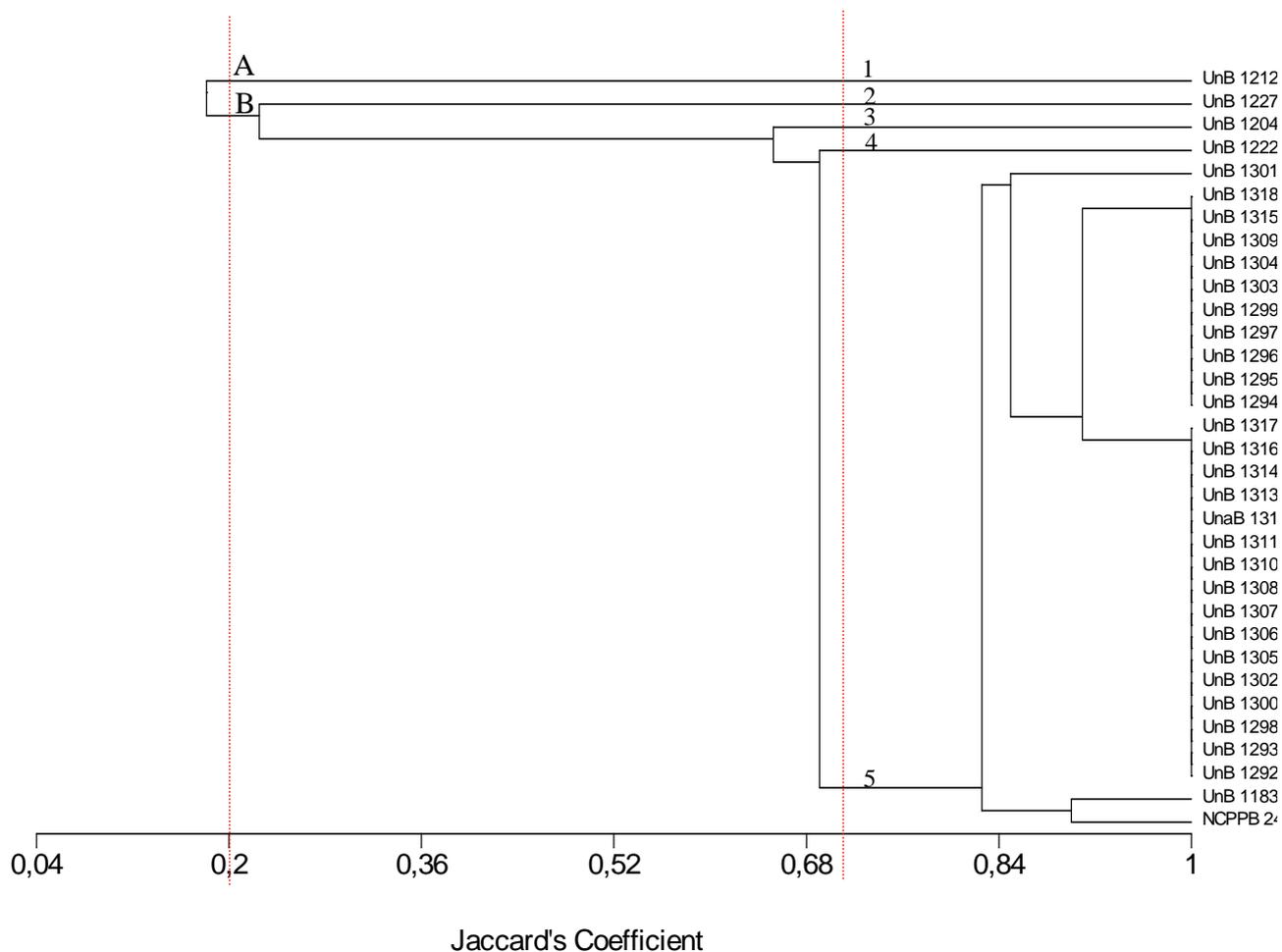


Figura 7. Dendrograma baseado no método UPGMA, de acordo com os perfis de amplificação gerada por ERIC-PCR, mostrando as relações entre os isolados entre isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* de videira.

REP-PCR

A utilização dos “primers” (REP1R – I e REP2 – I) gerou um total de 17 bandas variando de 190 a 2800 pb com várias bandas presentes em todos os isolados, entre elas a de aproximadamente 1500 pb indicada no gel (**Figura 8**).

O dendrograma (**Figura 9**) gerado pela comparação entre os perfis dos isolados permitiu a separação dos isolados em dois níveis. A 40 % de similaridade foram estabelecidos dois grupos, o primeiro identificado como grupo A englobou somente os isolados UnB 1295 e UnB 1293, ambos de Petrolina. O outro grupo, B inclui todos os outros isolados. A 70 % de similaridade foi possível estabelecer 4 grupos. O primeiro grupo inclui os isolados UnB 1293 e UnB 1295, coletados em 2003 e 2004 respectivamente. O grupo dois incluiu somente a estirpe UnB 1204. O grupo 3 reuniu em quatro grandes grupos a 100 % de similaridade 9, 11, 4 e 2 isolados, respectivamente todos coletados entre os anos de 2003 e 2006. Ainda nesse grupo foram reunidas a estirpe UnB 1183 e o isolado UnB 1306. O quarto e último grupo reuniu a estirpe UnB 1212 e estirpe tipo NCPPB 2475.

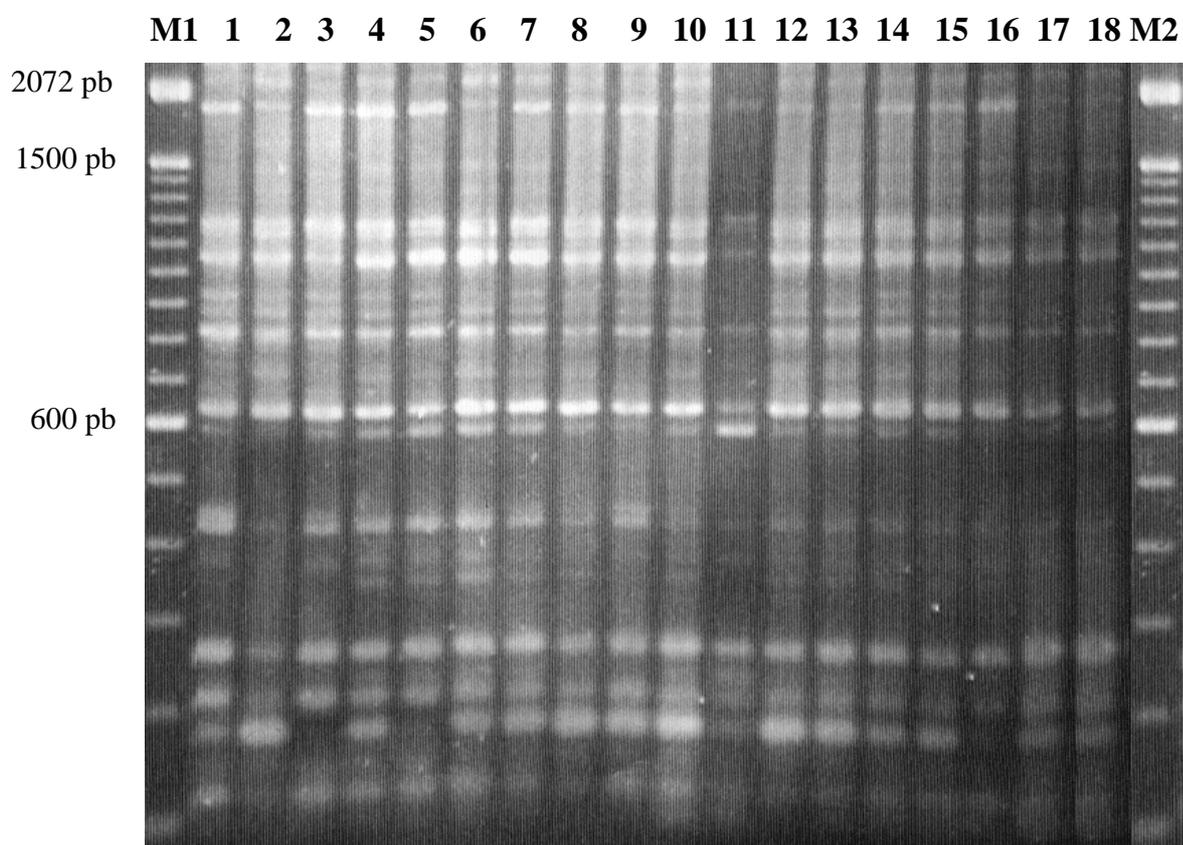


Figura 8. Análise eletroforética dos fragmentos gerados através de REP-PCR, a partir de DNA purificado de isolados utilizados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. (1) UnB 1301; (2) UnB 1302; (3) UnB 1303; (4) UnB 1304; (5) UnB 1305; (6) UnB 1306; (7) UnB 1307; (8) UnB 1308; (9) UnB 1309; (10) UnB 1310; (11) UnB 1311; (12) UnB 1312; (13) UnB 1313; (14) UnB 1314; (15) UnB 1315; (16) UnB 1316; (17) UnB 1317; (18) UnB 1318. M1 e M2- Marcador 100 pb DNA – Ladder (Gibco-BRL).

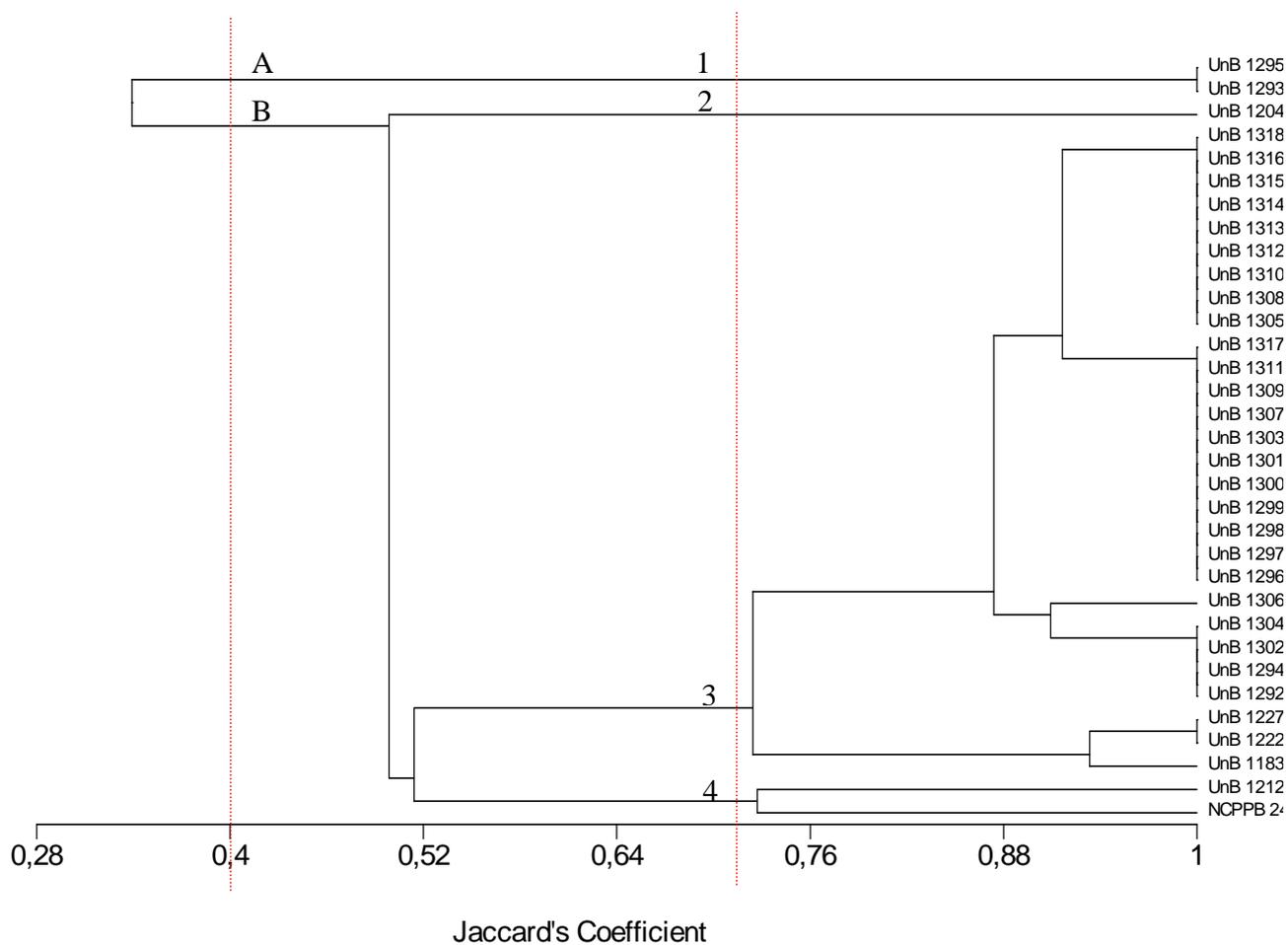


Figura 9. Dendrograma baseado no método UPGMA, de acordo com os perfis de amplificação gerada por REP-PCR, mostrando as relações entre os isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* de videira.

rep-PCR (REP, ERIC e BOX-PCR)

Através da análise conjunta dos dados gerados por ERIC, REP e BOX-PCR, todos os 33 isolados foram comparados. Foram scoreadas 39 bandas para os três “primers”. A análise do dendrograma permitiu estabelecer claramente 2 grupos a 50 % de similaridade. O grupo A composto pelas estirpes coletadas em 2001 UnB 1227, UnB 1222 e UnB 1212 e o grupo B com o restante dos isolados, incluindo a estirpe UnB 1204 coletada no ano de 2000 e a estirpe UnB 1183 coletada no ano de 1998. A 70 % de similaridade foi possível observar 5 grupos. Os 4 primeiros deles agruparam separadamente as estirpes UnB 1227, UnB 1222, UnB 1212 e UnB 1204. O grupo 5 reuniu todos os isolados coletados entre 2003 e 2006, a estirpe UnB 1183 coletada em 1998 e a estirpe tipo NCCPP 2475. Dentro desse grande grupo os isolados formaram grupos menores, mas todos com mais de 80 % de similaridade. A estirpe NCPPB 2475 foi agrupada com o a estirpe UnB 1183 com 80 % de similaridade. Os isolados UnB 1302 de Pernambuco e UnB 1292 da Bahia agruparam com 100 % de similaridade. Outros quatro grupos foram formados a 100 % de similaridade. Novamente foram agrupados separadamente os isolados UnB 1306, UnB 1315, UnB 1318, UnB 1293 e UnB 1295.

O dendrograma (**Figura 10**) gerado pela análise combinada confirmou em geral a separação obtida pela análise dos “primers” ERIC e BOX separadamente, formando dois grupos. O primeiro que inclui estirpes coletadas nos anos de 1998 e 2001 caracterizadas anteriormente por Trindade *et al.* (2005) e o segundo grupo maior formado pelos isolados coletados entre 2003 e 2006, além da estirpe tipo NCPPB 2475 e a estirpe UnB 1183, também caracterizada anteriormente.

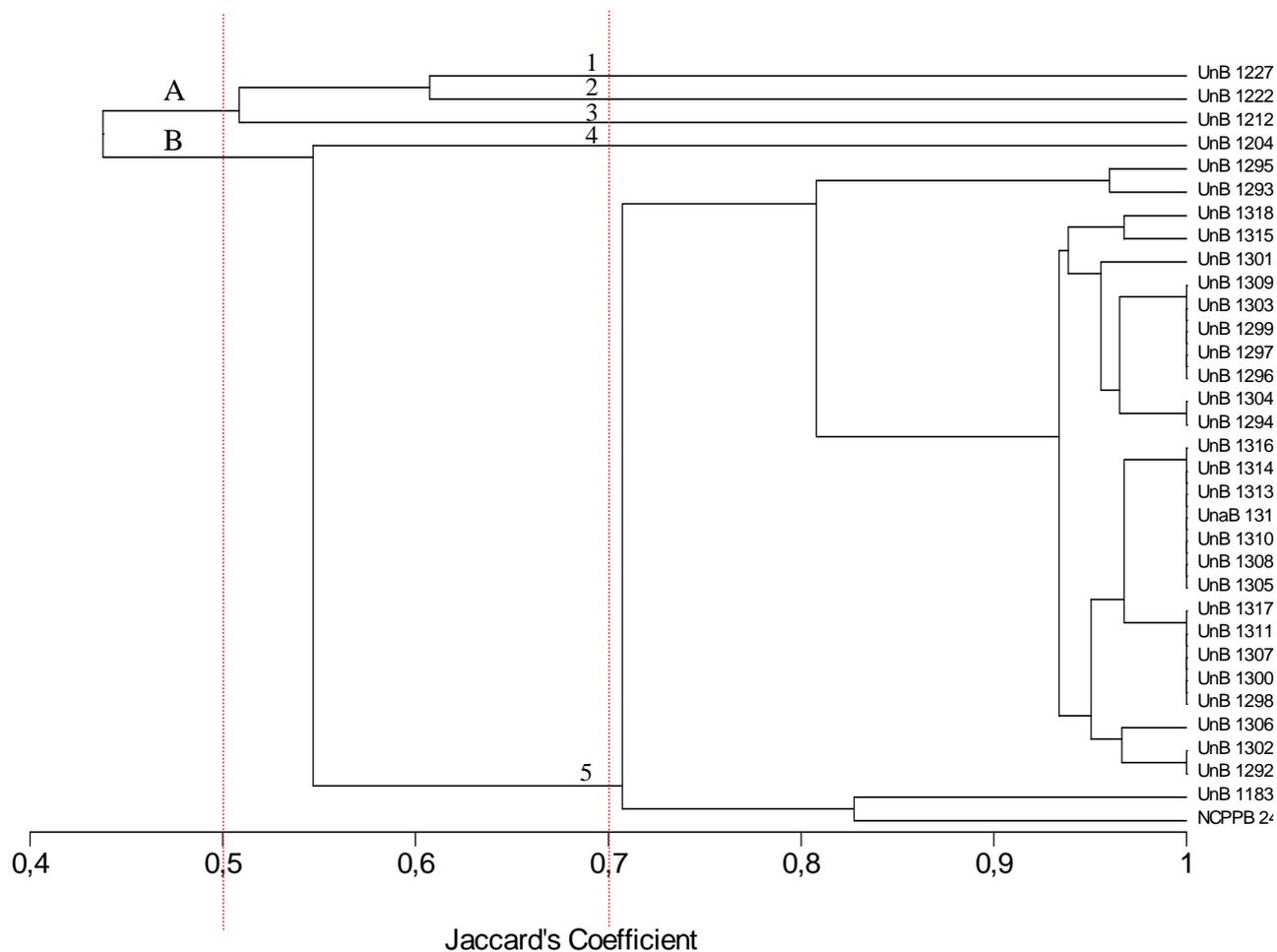


Figura 10. Dendrograma baseado no método UPGMA, de acordo com os perfis de amplificação gerados por rep-PCR (REP, ERIC e BOX), mostrando as relações entre os isolados entre os 33 isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, de videira.

3.2.3- ITS-RFLP

3.2.3.1- Amplificação da região ITS

As amplificações com os “primers” C1 – L1 correspondentes à região ITS (**Figura 11**) foram observadas em todos os 33 isolados de *Xcv*, produzindo um fragmento de 600 pb.

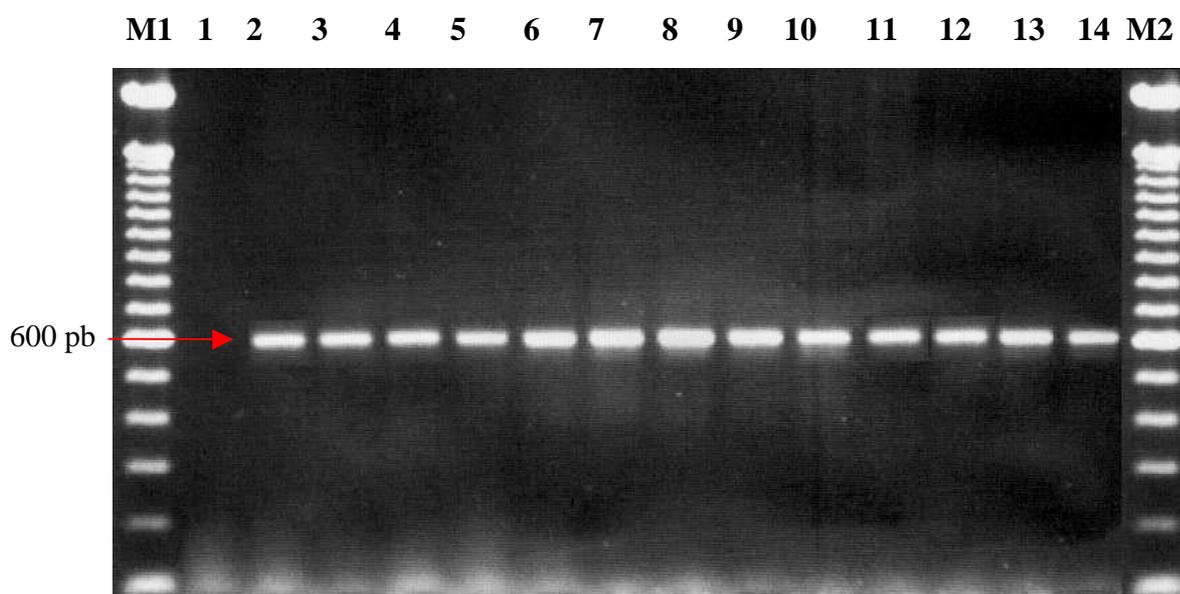


Figura 11. Amplificação de fragmentos gerados pelos “primers” C1 – L1 referentes à região espaçadora 16S – 23S (ITS) do DNA dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*: (1) Controle Negativo; (2) NCPPB 2475; (3) UnB 1292; (4) UnB 1294; (5) UnB 1296; (6) UnB 1298; (7) UnB 1300; (8) UnB 1302; (9) UnB 1304; (10) UnB 1306; (11) UnB 1308; (12) UnB 1310 e (13) UnB 1312; M1 e M2- Marcador 100 pb DNA – Ladder (Gibco – BRL).

3.2.3.2- Digestão dos produtos de PCR (ITS-RFLP)

A digestão com as enzimas *HaeIII* e *MspI*, da região 16S – 23S do rDNA amplificado, não mostrou polimorfismo (**Figura 12**) entre os 33 isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. Segundo a análise da sequência da região ITS de NCPPB 2475, obtida por Trindade (2002), com uso do programa Webcutter (Heiman, 1997) verificou-se a existência de 2 sítios de restrição para as enzimas *HaeIII* e *MspI* (**Tabela 6**). Os padrões observados confirmaram a existência dos 2 sítios, entretanto, não foi possível visualizar no gel os fragmentos menores de 8 e 37 pb.

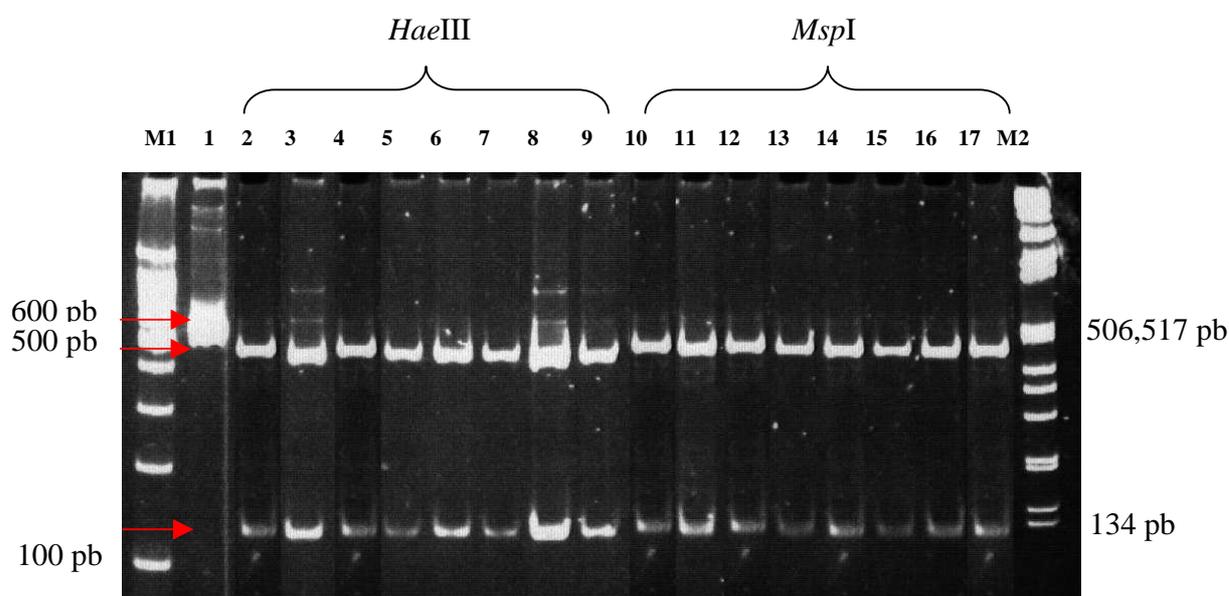


Figura 12. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8 % da região espaçadora 16 – 23S amplificada pelos “primers” C1 – L1 com o DNA purificado de diferentes isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*: (1) produto de 600 pb não digerido de UnB 1301 e produtos digeridos com as enzimas de restrição *HaeIII* (2 a 9) e *MspI* (10 a 17): (2) e (10) UnB 1301; (3) e (11) UnB 1302; (4) e (12) UnB 1303; (5) e (13) UnB 1304; (6) e (14) UnB 1305; (7) e (15) UnB 1306; (8) e (16) UnB 1307; (9) e (17) UnB 1308. M1 Marcador 100 pb DNA – Ladder e M2 1 kb (Promega).

Tabela 6. Análise de restrição da região ITS do rDNA de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* com as enzimas *HaeIII* e *MspI*, indicando a posição dos sítios de restrição na seqüência e tamanho dos fragmentos gerados.

Fragmentos	<i>HaeIII</i>^a	<i>MspI</i>^b
1	436	430
2	127	162
3	37	8

Posição dos sítios na seqüência:

^a127 e 164

^b162 e 170

4- DISCUSSÃO

Os 27 isolados coletados entre 2003 e 2006 em áreas de ocorrência do cancro bacteriano foram caracterizados com base nas propriedades bioquímicas, reação de hipersensibilidade em folhas de tomate e utilização de oligonucleotídeos específicos. Todos foram identificados como *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, de acordo Nayudu (1972), Malavolta Jr. *et al.* (1999), Lima *et al.* (1999) e Trindade *et al.* (2005, 2007).

Os “fingerprints” gerados por rep-PCR foram eficientes e reprodutíveis para isolados de *Xcv* coletados em diferentes anos, áreas e variedades de *V. vinifera*, permitindo observar polimorfismo dentro da patovar *viticola*.

Segundo Rademaker *et al.* (2000) a resolução taxonômica quando se utiliza REP, ERIC ou BOX-PCR não é sempre idêntica. Isto pode ser esperado devido ao diferente número de bandas que pode ser gerado por cada “primer”, pela condição de anelamento e pelo fato de que a prevalência ou distribuição dos elementos repetitivos pode variar em cada espécie/isolado.

Em *Xcv*, ERIC e BOX-PCR geraram um número menor de perfis que os obtidos com REP-PCR, onde foi detectado um maior polimorfismo entre os isolados. Resultados contrários foram observados por Louws *et al.* (1995) onde o elemento REP foi o menos indicado para diferenciar strains de *X. vesicatoria*. Para isolados de *X. translucens* os três “primers” geraram resultados equivalentes (Rademaker *et al.*, 2006). Vera-Cruz *et al.* (1996) estudando a variação em *X. oryzae* pv. *oryzae* observou que o uso combinado dos dados gerados pelos dois “primers” ERIC e REP foram mais úteis na diferenciação de linhagens.

Em isolados de *X. vesicatoria*, Louws *et al.* (1994) observaram variação dentro da patovar somente quando utilizado os protocolos de BOX e ERIC-PCR. Na avaliação da variabilidade genética de *Rhizobium meliloti* e outras bactérias de solo, a técnica de ERIC-PCR mostrou uma maior resolução que a de REP-PCR. Os padrões gerados por REP-PCR foram mais difíceis de serem analisados do que os gerado por ERIC-PCR. Os autores sugerem que seqüências ERIC são mais extensamente distribuídas em *R. melilot* que as seqüências REP.

Isolados de *X.c.campestris* e *X.a.citri* testados por Louws *et al.* (1994) mostraram perfis de REP, ERIC e BOX-PCR idênticos dentro de cada patovar, sugerindo que os

isolados de cada patovar tiveram uma herança evolucionária comum. Caracterizando isolados de *Xanthomonas* de alho, Gent *et al.* (2004) observou “fingerprints” genômicos altamente conservados dentro das origens geográficas, sugerindo que a estrutura populacional é altamente clonal. O estreito relacionamento entre os isolados sugere que a introdução de *X.a.allii* nas áreas produtoras tenha ocorrido em um ou poucos eventos, talvez através de sementes contaminadas.

No presente trabalho, BOX-PCR agrupou com 100 % de similaridade a estirpe de referência da Índia NCPPB 2475 e a estirpe UnB 1183, que foi coletada em 1998 na região de Petrolina, ano da provável introdução do patógeno no Brasil. Entretanto, o dendrograma gerado por ERIC-PCR agrupou esses mesmos isolados a 92 % de similaridade e REP-PCR agrupou-os separadamente, com similaridade menor que 52 %. A análise combinada dos três “primers” REP, ERIC e BOX-PCR novamente reuniu as estirpes em questão em um mesmo grupo com 70 % de similaridade. Dessa forma a alta similaridade observada entre essas duas estirpes provavelmente deve-se ao fato de que o patógeno havia sido introduzido recentemente e apresentou semelhança genética com a estirpe do país de origem da bacteriose. Todos os isolados brasileiros coletados entre 2003 e 2006, as estirpes UnB 1183 e NCPPB 2475 foram agrupados a 70 % de similaridade em BOX e ERIC, ficando as estirpes UnB 1204, UnB 1212, UnB 1222 e UnB 1227 em grupos separados. Trabalhos realizados por Trindade *et al.* (2005) com a análise combinada dos três “primers” também mostraram que esses isolados foram divergentes, o que foi confirmado no presente estudo.

O polimorfismo observado por Trindade *et al.* (2005) e confirmado no presente estudo, na população de *X.c.viticola* coletada entre os anos de 1998 e 2001, é interessante diante da recente introdução do patógeno no Brasil (1998). Trindade e colaboradores (2005) argumentaram que a bactéria pode ter sido introduzida a mais tempo, ou que houveram múltiplas introduções ao longo do tempo e ainda, que pode ter ocorrido uma única introdução e a variabilidade encontrada reflete a variabilidade da população original. Entretanto, entre os isolados de 2003 e 2006 tal variabilidade não foi observada o que pode ser justificado pela tendência à estabilização da população bacteriana, já que a patovar foi introduzido há quase dez anos no Brasil e o esperado seria um equilíbrio devido a adaptação às novas condições do meio.

Da mesma forma, assim como observada por esses autores não foi possível correlacionar, através dos estudos das seqüências repetitivas, a origem geográfica, a época de coleta e a cultivar de origem dos isolados com os perfis genômicos. Kaur *et al.* (2005) também não puderam correlacionar os resultados obtidos de rep-PCR com áreas de coleta de isolados de *X.a.cyamopsidis*, sugerindo que o patógeno foi difundido por meio de germoplasma contaminado.

A técnica de rep-PCR constitui-se em uma importante ferramenta no estudo da genética populacional de *X.c.viticola*, indicando ter ocorrido uma possível estabilização da população heterogênea observada por Trindade *et al.* (2005). Além disso, a técnica permitiu a observação de bandas comuns e perfis homogêneos entre os isolados que podem ser utilizados para o diagnóstico. Ao contrário, a técnica de ITS-RFLP não mostrou a variabilidade genética observada com rep-PCR. De maneira similar Manceau & Horvais (1996), analisando com enzimas de restrição a região ITS1, de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, observaram tratar de um grupo filogeneticamente homogêneo. Seria interessante testar um número maior de enzimas de restrição e realizar o seqüenciamento da região ITS em diferentes isolados.

CAPÍTULO 3

TOLERÂNCIA AO COBRE EM *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *VITICOLA*

1- INTRODUÇÃO

O controle do cancro bacteriano da videira, causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (*Xcv*), envolve um conjunto de práticas culturais (Instrução Normativa nº 09, de 20 de abril de 2006), o controle genético com obtenção de variedades resistentes e o controle químico preventivo com aplicações de fungicidas cúpricos (Malavolta Jr. *et al.*, 1999).

Segundo Romeiro (1995) ainda não existem bactericidas específicos para o controle de fitobactérias. Entretanto, em casos específicos são utilizados fungicidas protetores, normalmente os cúpricos e tiocarbamatos, que são capazes de retardar, inibir ou bloquear a multiplicação de bactérias graças ao seu efeito bacteriostático ou bactericida.

Apesar de não existirem produtos registrados para o controle do cancro bacteriano no Brasil, recomenda-se a aplicação preventiva de fungicidas cúpricos (Malavolta Jr. *et al.*, 1999; Lima & Moreira, 2002) minimizando assim os danos causados e a disseminação do patógeno (Malavolta Jr. *et al.*, 1999). Em contrapartida, resultados de pesquisas iniciais na Índia mostram que somente a utilização do controle químico é pouco efetiva no combate à doença (Chand *et al.*, 1994, citado por Araújo, 2001), sendo necessário estabelecer estratégias corretas e práticas eficientes de manejo da doença.

Como consequência do uso contínuo e muitas vezes indiscriminado de compostos cúpricos na agricultura tem sido relatada a ocorrência de bactérias fitopatogênicas ou saprofíticas resistentes ao cobre (Cooksey, 1990).

O estudo da resistência a esses compostos somente se iniciou na metade da década de 90. Uma das razões para este começo tardio seria o fato de que a resistência para o bactericida mais comumente utilizado, o cobre, não ter sido detectada até a década de 80. Outra explicação seria o fato de que a presença de bactérias resistentes no campo nem sempre levou ao fracasso do controle com pulverizações cúpricas (Cooksey, 1990).

Em *Xanthomonas* spp., associadas à mancha bacteriana do tomateiro, o primeiro relato de resistência ao cobre foi feito na Flórida (EUA) por Marco & Stall (1983). No entanto, essa resistência deveria estar presente nas populações bacterianas mesmo antes deste relato, já que isolados coletados anteriormente (desde 1968) também se mostraram resistentes (Cooksey, 1990). Marco & Stall (1983) avaliaram a sensibilidade ao cobre, com base na viabilidade de células de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (*X. vesicatoria*) (reclassificada como *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* por Vauterin *et al.*, 1995) expostas a soluções de cobre, e verificaram que os íons de cobre não eram efetivos para o controle da doença. Uma maior eficiência no controle era obtida somente com o uso combinado com carbamatos (mancozeb).

Atualmente a resistência ao cobre está difundida nas populações de *X. vesicatoria* em várias regiões geográficas. Aguiar *et al.* (2003) objetivando avaliar o efeito de diferentes formulações cúpricas e cuprorgânicas (sulfato de cobre, oxiclreto de cobre, óxido cuproso, óxido cuproso + mancozeb) em populações residentes de *X. vesicatoria* do filoplano de pimentão e na redução da severidade da doença, observaram que esses produtos foram pouco eficazes para o controle após o estabelecimento da doença. À mesma conclusão chegaram Camargo *et al.* (2001) onde, avaliando o progresso da mancha-bacteriana com aplicação de oxiclreto de cobre verificaram que este produto foi, na maioria das vezes, ineficiente. Quezado-Duval *et al.* (2003) avaliaram a sensibilidade ao cobre *in vitro* em 389 isolados de *Xanthomonas* spp. associados à mancha-bacteriana do tomateiro, inclusive *X. vesicatoria*. Nenhum dos isolados estudados foi resistente à oxitetraciclina, no entanto, houve diferença entre os isolados quanto à sensibilidade ao sulfato de cobre e ao sulfato de estreptomicina nas concentrações empregadas.

No início dos anos 80, na Califórnia (EUA) já se observava isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*P. tomato*), agente causal da pinta bacteriana do tomateiro, resistentes ao hidróxido de cobre, uma vez que as aplicações do produto não reduziam a severidade da doença. Quando testados *in vitro* alguns isolados também se mostraram tolerantes ao sulfato de cobre, com uma concentração mínima inibitória (CMI) de 1.2 – 2.0 mM (Cooksey, 1990). Avaliando isolados recuperados de plantas de tomate para processamento industrial, em diferentes meios suplementados com cobre, Silva & Lopes (1995) observaram diferenças na resistência ao íon (variando entre 250 a 1800 ppm),

bem como no grau de resistência de acordo com o meio utilizado. Em *P. syringae*, agente causal da necrose apical em manga, Carzola *et al.* (2002) observaram resistência ao metal em isolados de Portugal e Espanha com CMI variando de 1.0 a 3.2 mM.

Não só a resistência a metais pesados como também os mecanismos envolvidos nesse processo têm sido estudados e descritos em procariotos. Tanto as células eucarióticas como procarióticas requerem cobre para seu crescimento normal. O cobre é essencial para várias enzimas envolvidas na respiração, tais como as oxigenases e proteínas de transporte de elétrons. Por outro lado, o cobre acima de uma certa concentração tem a habilidade de gerar radicais livres capazes de danificar o DNA e membranas lipídicas, sendo tóxico às células. Dessa forma, seu nível intracelular deve ser controlado. Como consequência, as bactérias desenvolveram sistemas para se proteger da concentração excessiva de cobre e ainda assegurar suas necessidades (Voloudakis *et al.*, 2005).

Segundo Silver & Phung (1996) é provável que os sistemas de resistência a metais tóxicos surgiram assim que a vida começou no planeta, inicialmente poluído por atividades vulcânicas e outras fontes geológicas. Como ocorre com a resistência a determinados antibióticos, a resistência a metais pesados é preexistente à recente atividade humana, que criou a poluição ambiental. Quanto aos mecanismos envolvidos no processo de tolerância ao cobre pode-se considerar que: 1) não existe nenhum mecanismo geral para resistência aos íons tóxicos; 2) sistemas de resistência a esses metais têm sido encontrados em plasmídeos de várias espécies de bactérias; 3) a resistência pode ocorrer pela remoção dos íons tóxicos que entram na célula por sistemas que envolvem transporte de nutrientes e por detoxificação enzimática (redução química), convertendo íons mais tóxicos em menos tóxicos, e ocasionalmente, pela bioacumulação ou seqüestro (intracelularmente ou na superfície da célula).

Os sistemas de remoção de íons tóxicos constituem o principal mecanismo envolvido na resistência ao cobre encontrados em plasmídeos e cromossomos. Estes podem se dar por meio de ATPases ou quimiosmose. Esses sistemas são freqüentemente, mas nem sempre, os mesmos em todos os tipos bacterianos (Cooksey, 1990). Silver & Phung (1996) citam os sistemas de conversão de formas tóxicas de mercúrio (Hg^{2+}) para mercúrio metálico menos tóxico e volátil e no caso de estirpes de *Mycobacterium scrofulaceum* resistentes ao cobre, que acumulam intracelularmente um precipitado preto de CuS .

Como citado anteriormente, os sistemas que conferem resistência têm sido localizados principalmente em plasmídeos, mas também são determinados por genes cromossomais. Em 1993, na Califórnia, foi descrito um gene cromossomal conferindo resistência ao cobre em *X. campestris* pv. *juglandis* (Lee *et al.*, 1994). Posteriormente outro gene, não muito comum, localizado no cromossomo de um isolado de pimentão de Taiwan foi relatado por Basim *et al.* (2005) em *X. vesicatoria*. Este gene apresentou alta homologia com o *copR* de *P. tomato*.

Os plasmídeos são elementos extracromossomais capazes de serem transferidos entre isolados, espécies e gêneros, sendo os mais estudados os de *Burkholderia*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, entre as fitobactérias (Vivian *et al.*, 2001). Suas funções são muito variadas, podendo conter genes de virulência, toxinas e os que codificam funções fisiológicas (Ferreira, 2003). A resistência ao cobre conferida por plasmídeos tem sido amplamente estudada em *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. A clonagem e caracterização dos genes plasmidiais e cromossomais que conferem em *X. campestris* e *P. syringae* mostram que esses sistemas são relacionados e altamente homólogos (Valoudakis *et al.*, 1993).

Trabalhos realizados por Stall *et al.* (1986), na Flórida (EUA) revelaram um plasmídeo associado à resistência ao cobre em *X. vesicatoria*. Esse plasmídeo, denominado pXvCu foi transferido por conjugação para isolados sensíveis que passaram a apresentar tolerância. Posteriormente, em todos os isolados de *X. vesicatoria* avaliados na Califórnia (EUA) por Cooksey (1990), foi identificado um plasmídeo grande homólogo aos identificados nos primeiros isolados resistentes a cobre, o pXvCu. Esses plasmídeos são normalmente auto-transmissíveis, polimórficos quando analisados com enzimas de restrição e de tamanho variável, normalmente 200 kb (Cooksey, 1990).

A maioria dos isolados de *X. vesicatoria* resistentes ao cobre transferem o pXvCu à progênie e foram isolados de plantas em estados e continentes diferentes. Parece provável que isolados contendo pXvCu tenha sido disseminados em material propagativo de tomate e pimentão para diferentes áreas. A transferência conjugativa poderia também ser importante na expansão e estabelecimento local do plasmídeo e em populações de campo.

No intuito de monitorar a presença de genes de resistência ao cobre, Garde & Bender (1991) desenharam uma sonda de DNA baseada no gene codificado pelo plasmídeo de

pXv10A de *X. vesicatoria*, apresentando alta especificidade para genes de resistência a cobre presentes nesse patógeno.

Ainda em *X. vesicatoria*, Valoudakis *et al.* (2005) descreveram recentemente uma nova ORF (open reading frame/seqüência aberta de leitura) induzida por cobre, chamada de *copL*. Análises dessa seqüência mostraram homologia com os genes *copAB* de *X. axonopodis* pv. *citri*, *X. campestris* pv. *campestris* e *Xylella fastidiosa*.

Os mecanismos de resistência em *P. tomato* são também muito estudados. Bender & Cooksey (1985, 1986) e Cooksey (1987), citados por Cooksey (1990) observaram que todos os isolados resistentes ao cobre de *P. tomato* carregavam um plasmídeo de 3,5 kb chamado pPT23D que conferia tal resistência. Este plasmídeo não mostrou variação em tamanho ou nos perfis, apresentando quatro ORFs de 4,5 kb, chamadas de *copA*, *copB*, *copC* e *copD*, organizadas em seqüência uma atrás da outra, com um promotor induzido por cobre localizado antes de *copA*. Tal como a *P. syringae*, isolados resistentes de *P. cichorii*, *P. putida*, *P. fluorescens* também possuem o operon *cop* homólogo.

Em *Pseudomonas* sp. existem dois genes reguladores denominados de *copR* e *copS*. e outros quatro genes estruturais, *copABCD*, como citado anteriormente. Nesta bactéria o armazenamento do excesso de cobre no espaço periplasmático é considerado como uma proteção à célula da toxidez do cobre (Silver & Phung, 1996).

Segundo Cooksey (1990) as proteínas CopA e CopC de *P. tomato* estão localizadas no espaço periplasmático e CopD e CopB na membrana externa. Como as proteínas de membrana CopD e CopB estão envolvidas no movimento de cobre através das membranas internas e externas não está bem compreendido (Silver & Phung, 1996).

Para evitar a toxidez do cobre acumulado em suas células, *P. tomato* parece não transformar o cobre. O mecanismo alternativo aceito é que os íons sejam aproveitados em produtos celulares. Análises mostraram que as proteínas CopA e CopB são ricas em metionina e histidina, aminoácidos que se ligam ao cobre. Além disso, essas proteínas estão arranjadas em hélice o que indica a ligação múltipla recobrando os íons do metal (Silver & Phung, 1996). Estudos de Cooksey & Azad (1992) mostraram que *P. syringae* que carregam o operon *cop* clonado acumularam mais cobre total celular que os isolados sem o operon, sustentando o papel de seqüestro de cobre no mecanismo de resistência de cobre. É provável

que este mecanismo seja comum em várias espécies de *Pseudomonas* resistente ao cobre associadas a plantas.

Carzola *et al.* (2002) verificaram que a maioria dos isolados de *P. syringae* em manga, de Portugal e Espanha, resistentes ao cobre, carregavam plasmídeos de 62 kb. Contudo, estes também estavam presentes em isolados sensíveis ao cobre. Seus estudos mostraram que esses plasmídeos continham genes parcialmente homólogos ao operon *copABCD*.

Os primeiros estudos de tolerância ao cobre em *X. campestris* pv. *viticola* foram realizados por Chand *et al.* (1991), citado por Araújo (2001). Avaliando diversos produtos a base de cobre, além de antibióticos, no controle do cancro bacteriano da videira na Índia, os autores concluíram que a ação desses compostos não apresentava controle significativo na severidade da doença. Em condições de campo, Chand *et al.* (1992), citado por Nascimento & Mariano (2004), observaram que o uso de oxiclreto de cobre, seguido de aplicações de calda bordalesa, reduziram a severidade dos sintomas do cancro. Posteriormente Chand *et al.* (1994), citado por Lima & Moreira (2002), avaliaram a eficiência de produtos tais como oxiclreto de cobre, sulfato de estreptomicina, tetraciclina e bacterinol em mudas com diferentes níveis de infecção por *Xcv* em viveiro num período de 4 anos, verificando que a bactéria havia desenvolvido resistência ao cobre e ao antibiótico.

No Brasil, Nascimento & Silva (1999) avaliaram a ação de alguns agroquímicos (abiatato de cobre, acibenzolar-S-methyl, hidróxido de cobre, oxiclreto + mancozeb, e potássio e fósforo) no controle *in vitro* do patógeno e verificaram que o hidróxido de alumínio, oxiclreto + mancozeb e abiatato de cobre, proporcionaram maior inibição de *Xcv*. Lima & Mashima (2000) testaram o efeito de oxitetraciclina, sulfato de cobre, amônia quartenária, cloranfenicol, cobre líquido e termoterapia (água quente) no tratamento de bacelos com baixos níveis de infecção da bacteriose, verificando que os sintomas persistiam em porcentagens variadas, sendo dessa forma ineficazes no processo curativo. Silva *et al.* (2000) testaram *in vitro* sulfato de gentamicina + oxiclreto de cobre; oxitetraciclina + estreptomicina; oxiclreto de cobre + mancozeb; aminoácidos; kasugamicina; íon zinco + hidróxido de cobre; íon zinco + oxiclreto de cobre; oxitetraciclina + sulfato de cobre tribásico; cal + sulfato de cobre, entre outros produtos. Os índices de inibição do patógeno

variaram com os tratamentos, entretanto, a mistura de sulfato de gentamicina e oxiclreto de cobre foi a que apresentou a maior inibição do crescimento do patógeno.

A tolerância ao sulfato de cobre em cinco estirpes brasileiras de *Xcv* foi determinada por Araújo *et al.* (2003) que verificaram uma tolerância *in vitro* até 300 µg/ml de íons de cobre, no entanto, as bases genéticas da resistência ao cobre nesta bactéria ainda não foram alvo de estudos.

OBJETIVOS

Levando em consideração a possibilidade de ocorrência de resistência ao único método de controle químico disponível e mais utilizado nas áreas de ocorrência da doença e diante da falta de estudos nesse sentido, foram objetivos deste trabalho:

- (1) Caracterizar isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* quanto à tolerância *in vitro* ao cobre.
- (2) Detectar por PCR a presença em *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* de genes homólogos ao gene *copA* presente nos genomas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.
- (3) Seqüenciar e caracterizar os produtos amplificados correspondentes ao gene *copA* em diferentes isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Isolados bacterianos

No estudo de tolerância ao cobre *in vitro* (**Tabela 7**) foram utilizados: 11 isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (*Xcv*) obtidos de amostras de plantas de videira coletadas na região do Vale do São Francisco e/ou recebidas para análise no Laboratório de Fitopatologia da Universidade de Brasília – UnB; 7 estirpes provenientes da Coleção de Bactérias Fitopatogênicas do Departamento de Fitopatologia – UnB, já caracterizados anteriormente por Trindade *et al.* (2005); 2 estirpes obtidas junto a Coleção de Bactérias do Instituto Biológico de Campinas (IBSBF 1385 e 1369) e a estirpe tipo (NCPBB 2475), originária da Índia, obtida da National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Central Science Laboratory (Sand Hutton, York, Reino Unido, import permit nº 05227), totalizando 21 isolados bacterianos. Os isolados utilizados neste estudo foram selecionados para representar diferentes áreas e épocas de coleta de *Xcv*, de 1998 a 2006.

2.2- Metodologia 1

2.2.1- Meio de cultura e produtos utilizados

Nos testes de sensibilidade ao cobre foi utilizado o meio MMCC – Médium Minimal Complexing Copper (Pohronezny *et al.*, 1992), que possui baixa capacidade de complexar os íons de cobre.

Tabela 7. Designação, origem e ano de coleta dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* utilizados no estudo de tolerância ao cobre.

Identificação		Cultivar de origem	Local de coleta	Ano de Coleta
1	NCPPB 2475	cv.Anab-e-Shahi	Índia	1972
2	UnB 1183	cv.Red Globe	Faz. Vale das Uvas – PE	1998
3	IBSBF 1369	cv.Red Globe	Petrolina – PE	1998
4	IBSBF 1385	cv.Itália	Teresina – PI	1998
5	UnB 1190	cv.Red Globe	Projeto Senador Nilo Coelho – PE	1998
6	UnB 1204	cv.Red Globe	Projeto Maniçoba, Juazeiro – BA	1999
7	UnB 1205	cv.Itália	Faz. Labrunier, Sobradinho – BA	2000
8	UnB 1216	cv.Red Globe	Projeto Bebedouro, Petrolina – PE	2000
9	UnB 1212	cv.Itália	Projeto Senador Nilo Coelho – PE	2001
10	UnB 1222	cv.Perlette ou Itália	Projeto Bebedouro, Petrolina – PE	2001
11	UnB 1292	cv.Red Globe	Projeto Mandacaru, Juazeiro – BA	2003
12	UnB 1293	cv.Superior x IAC 766	Faz. Vale das Uvas – PE	2003
13	UnB 1294	cv.Thompson x Paulsen	Faz. Boa Esperança, Petrolina – PE	2003
14	UnB 1295	cv.Festival	Projeto Bebedouro, Petrolina – PE	2004
15	UnB 1298	cv.Itália	Projeto Bebedouro, Petrolina – PE	2004
16	UnB 1299	cv.Thompson	Faz. MARIAD, Petrolina – PE	2004
17	UnB 1301	cv.Thompson	Petrolina – PE	2004
18	UnB 1310	cv.Festival	Faz. Frutirenda, Petrolina – PE	2005
19	UnB 1314	cv.Red Globe	Faz. Boa Esperança, Petrolina – PE	2005
20	UnB 1316	cv.Red Globe	Faz. PECCEL, Juazeiro – BA	2005
21	UnB 1318	cv.BRS – Morena	Caldas – MG	2006

Os produtos utilizados foram o sulfato de cobre (CuSO_4), 20 % do produto ativo (Pa), com nome comercial de Cupro-Dimy e o oxiclreto de cobre ($\text{Cu}_2\text{Cl}(\text{OH})_3$), 35 % Pa, com nome comercial de Agrinose. As concentrações finais dos produtos foram: 0, 10, 20, 30 40, 50 e 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Os produtos cúpricos foram preparados como soluções estoque na concentração de 2×10^4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e adicionados ao meio assepticamente antes de vertê-lo em placas de Petri.

2.2.2- Preparo das suspensões

Os isolados bacterianos foram recuperados das culturas mantidas em glicerol 30 %, a -80 °C e transferidos para meio 523. Após 72 h, preparou-se uma suspensão bacteriana, em água destilada estéril, calibrada para $2,54 \times 10^8$ ufc/ml, utilizando-se espectrofotômetro digital UV – 1203 (Shimazu Corporation) a 550 nm de comprimento de onda e 0,575 de absorbância. Em seguida as suspensões foram diluídas em série até 10^{-5} (1:100.000).

2.2.3- Inoculação e avaliação

Uma alíquota de 50 μl da suspensão bacteriana padronizada e diluída a 10^{-5} , foi depositada e espalhada, com auxílio de uma alça de Drigalski flambada, sobre o meio MMCC contendo cobre nas concentrações desejadas. Após a inoculação, as placas foram incubadas a 28 °C. Para cada isolado foram realizados três repetições e um controle (placa contendo meio MMCC sem adição de cobre).

A avaliação foi realizada após 72 h de incubação, a 28 °C, através da contagem de colônias, expressas em ufc (unidade formadora de colônia) de cada placa. Em seguida calculou-se a média entre as três placas e os dados foram transformados para ufc/ml.

2.3- Metodologia 2

2.3.1- Meio de cultura e produto utilizado

Utilizou-se a metodologia descrita por Marco & Stall (1983), utilizada para *Xcv* por Araújo (2001). Preparou-se meio nutriente-agar (NA) e como fonte de íons de cobre, utilizou-se Cupro-Dimy, contendo 20 % de CuSO_4 (sulfato de cobre). Testou-se as seguintes concentrações: 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 e 400 $\mu\text{g/ml}$.

2.3.2- Preparo das suspensões

As suspensões bacterianas foram preparadas conforme descrito no item 2.2.2.

2.3.3- Inoculação e avaliação

A partir das suspensões preparadas anteriormente foram retiradas alíquotas de 50 μl e adicionadas a tubos “Eppendorf” contendo 1 ml de solução de íons de cobre nas concentrações citadas anteriormente. Após 1 h, alíquotas de 100 μl de cada tratamento foram retiradas e transferidas para placas de Petri, contendo meio NA (sem adição de cobre subsequente). A sensibilidade foi avaliada após 72 h de incubação, a 28 °C, através da análise da presença ou ausência de colônias bacterianas nas placas.

2.4- Detecção e caracterização de seqüências do gene *copA* em *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*

2.4.1- Amplificação do gene *copA*

Para amplificação de um fragmento de 925 pb do gene *copA* (Tabela 8) foram utilizados os “primers” *copAL* e *copAR*.

Tabela 8. Descrição dos “primers” desenhados com base nas seqüências do gene *copA* de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Trindade *et al.*, dados não publicados).

“Primer”	Seqüência (5’ → 3’)
<i>copAL</i>	CGA CCT GTC CGA CGT CAA
<i>copAR</i>	CGG CAT GTC GAT GGT GT

Os “primers” para a região *copA* foram desenhados a partir de seqüências de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*X.c.campestris*) strain ATCC 33913 (NC 003902) e de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*X.a.citri*) strain 306 (NC 003919), depositadas no GenBank. Essas seqüências foram analisadas pela conexão eletrônica ao NCBI (National Center for Biotechnology Information) e comparadas utilizando o programa BLAST (Fassler *et al.*, 2000). A partir dos alinhamentos obtidos foi feito o desenho dos “primers” utilizando-se o programa Primer 3 (Rozen & Skaletsky, 1998). Para seleção dos “primers” procurou-se localizá-los em regiões de menor divergência entre as seqüências de *X.c.campestris* e *X.a.citri*.

As amostras de DNA de todos os isolados bacterianos foram submetidas a amplificação com os “primers” *copA* em termociclador PT – 100 (MJ Research, Watertown, Mass) onde inicialmente foram desnaturadas a 95 °C por 2 min, posteriormente submetidas a 30 ciclos de 95 °C por 45 s; 1 min a 58 °C para anelamento dos “primers” e 2 min a 72 °C para a extensão, e uma extensão final de 72 °C por 10 min.

Para a PCR foram utilizados: tampão da enzima 1 X (20 mM Tris HCl, pH 8.4, 50 mM de KCl); 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 mM de cada um dos dNTPs (GIBCO – BRL); 25 pmol

de cada um dos “primers”; 1.25 U de *Taq* DNA polimerase (GIBCO – BRL) 5 ng de DNA e água MilliQ, para um volume final de 25 µl.

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 1 %. Após a corrida o gel foi corado, descorado e fotografado. O marcador utilizado foi o 100 pb DNA – Ladder (GIBCO – BRL).

2.4.2- Sequenciamento dos produtos de PCR amplificados com os “primers” *copAL* e *copAR*

A estirpe NCPPB 2475 e os isolados UnB 1292, UnB 1295, UnB 1298, UnB 1399 e UnB 1318 foram selecionados para sequenciamento por representarem os mais divergentes quanto à CMI de cobre observada entre os isolados estudados.

As reações de sequenciamento dos produtos de PCR foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Uma alíquota de 20 µl dos produtos das ampliações geradas pelos “primers” *copAL* e *copAR* foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1 %, a 75 V. Em seguida visando eliminar produtos inespecíficos somente as bandas de 900 pb foram excisadas do gel, transferidas para tubos “Eppendorf”, cobertas com 1 ml de água MilliQ estéril, e mantidas a 37 °C por 1 h em banho-maria. Após a eluição do DNA, 5 µl do mesmo foi utilizado para uma nova reação de PCR com os “primers” em questão, sendo então os produtos purificados da seguinte forma: 30 µl do produto foi adicionado a 15 µl de acetato de amônio e 70 µl de etanol 100 %. Em seguida as amostras foram mantidas a –80 °C por 2 h, centrifugadas por 40 min, a 40.000 rpm (12.000 x g), a 4 °C. Desprezou-se o sobrenadante, os precipitados foram lavados com 100 µl de etanol 100 % e centrifugados a 5.000 rpm (1500 x g), por 5 min. Novamente descartou-se o sobrenadante, sendo deixado os precipitados secando em estufa a 37 °C, por 30 min. Por fim, os precipitados foram ressuspendidos em 15 µl de água MilliQ estéril. Em seguida 1 µl dos produtos de PCR precipitados foi adicionado a 1 µl de cada um dos “primers” *copAL* e *copAR*, na concentração de 2 µmol/ µl, e então enviados para sequenciamento.

No sequenciamento em cada uma das direções dos “primers”, a reação de amplificação para incorporação dos nucleotídeos marcados foi realizada em um volume

final de 10 µl, compreendendo 4 µl do kit Dynamic ET Terminator (Pharmacia Biotech, EUA); 2 µl do “primer” (10 mM); 1 µl do produto de PCR, na concentração de 40 ng/ µl e 3 µl de água MilliQ. Foram realizados 30 ciclos de amplificação em termociclador Gene Amp PCR System (Applied Biosystems), de acordo com o programa: 95 °C por 20 s; 50 °C por 15 s e 60 °C por 1 min.

O sequenciamento foi realizado em seqüenciador por capilaridade Mega Bace 1.000 – DNA Analyzer System (Pharmacia Biotech, EUA) com condições de corrida envolvendo voltagem de injeção de 3 KV, tempo de injeção de 60 s e voltagem de corrida de 9 V.

2.4.3- Análise das seqüências

A qualidade das seqüências obtidas nas reações de sequenciamento automático foi verificada pelo programa PHRED (Erwin *et al.*, 1998). As seqüências foram analisadas através de conexão eletrônica ao NCBI (National Center for Biotechnology Information – Estados Unidos). A comparação foi realizada utilizando-se o programa BLAST (Fassler *et al.*, 2000), com seqüências já depositadas no GenBank, que abrange os bancos de dados do EMBL e DDBS.

As seqüências nucleotídicas dos isolados foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) com as seqüências do gene *copA* depositadas no GenBank de *X.c.campestris* strain ATCC 33913 e *X.a.citri* strain 306.

A análise filogenética foi realizada utilizando o conjunto de programas PHYLIP versão 3.6 (Felsenstein, 2005). Foi utilizada uma seqüência de no mínimo 600 nucleotídeos. A distância evolutiva foi calculada utilizando o programa DNAdist, pelo método de correção de dois parâmetros de Kimura (Kimura, 1990). As relações filogenéticas foram determinadas pelo método de Neighbor Joining. A reprodutibilidade de cada ramo da árvore foi estimada por um valor de “bootstrap” de 1000 réplicas (Hillis & Bull, 1993). O programa Consensus Tree foi utilizado para gerar uma árvore consenso. A árvore foi obtida pelo programa TreeView. A seqüência do gene *copA* de *X. oryzae* pv. *oryzae* foi utilizada como grupo externo. Um valor de “bootstrap” acima de 70 % foi considerado confiável.

3- RESULTADOS

3.1- Metodologia 1

Através da contagem em cada repetição, obteve-se um valor médio do número de colônias, para cada tratamento com os diferentes produtos. Em seguida esses valores foram transformados para ufc/ml (**Tabelas 9 e 10**).

Para todos os tratamentos, com ambos os produtos utilizados (sulfato e oxiclreto de cobre) houve um decréscimo do número de colônias bacterianas, com o aumento da concentração do produto, quando comparado ao controle. Observando-se o crescimento ou inibição das colônias, considerou-se como concentração mínima inibitória (CMI), a menor concentração de cobre que não permitiu o crescimento bacteriano.

De uma forma geral, como mostrado na **Figura 13** e **Figura 14**, observou-se uma evolução e uma variabilidade no crescimento da tolerância ao cobre ao longo dos anos, de 1998 a 2006, em que isolados de *Xcv* foram coletados nas áreas de ocorrência do cancro bacteriano.

A concentração mínima inibitória nos tratamentos com sulfato de cobre (**Tabela 9**) variou de 10 a 60 µg/ml. A estirpe tipo NCPPB 2475 foi a única que se mostrou totalmente sensível ao cobre. Os isolados UnB 1205 e UnB 1293 não apresentaram crescimento a 20 µg/ml. Apresentaram uma CMI de 30 µg/ml os isolados UnB 1204, UnB 1216, UnB 1222 e UnB 1299. Com 40 µg/ml o número de colônias começou a reduzir. Nessa faixa não houve crescimento para os isolados: UnB 1183, IBSBF 1369 e 1385, UnB 1190, UnB 1212, UnB 1294, UnB 1310 e UnB 1316. Com 50 µg/ml não houve crescimento dos isolados: UnB 1292, UnB 1298, UnB 1301, UnB 1314 e UnB 1318. Observou-se uma CMI de 60 µg/ml somente para o isolado UnB 1299.

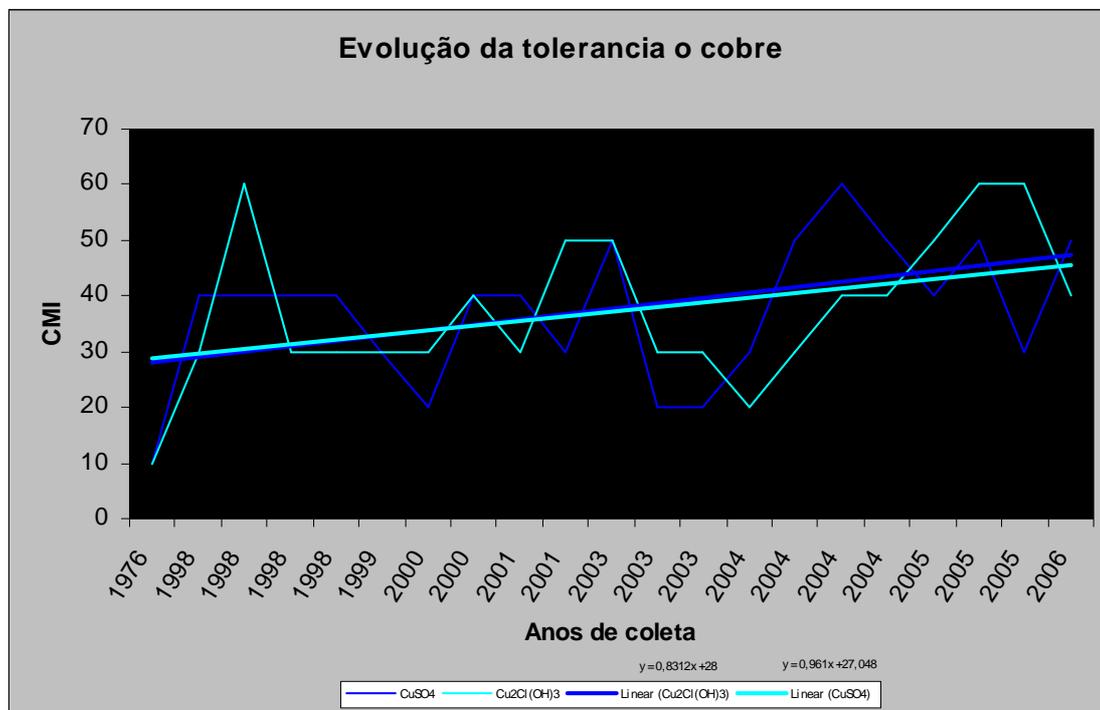


Figura 13. Evolução na tolerância ao cobre, expressa pela concentração mínima inibitória em $\mu\text{g/ml Cu}^{2+}$, de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* coletados entre os

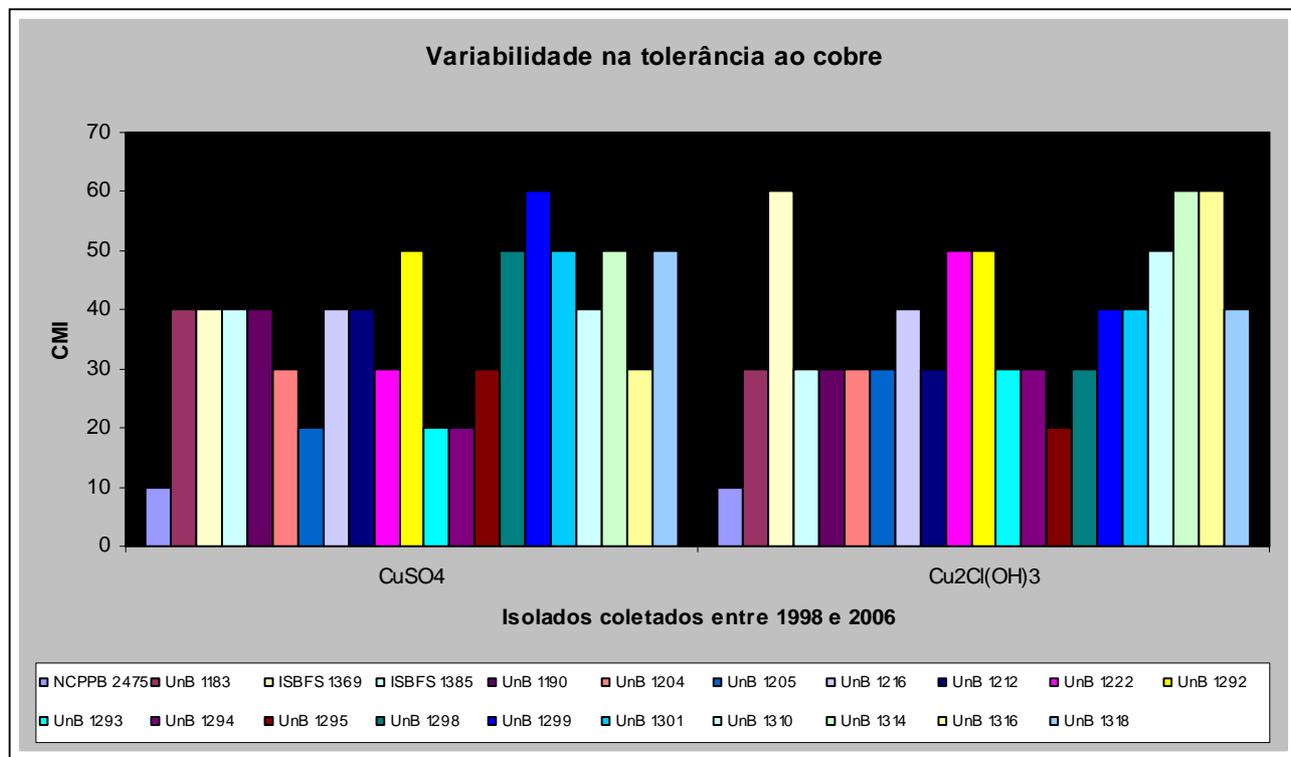


Figura 14. Variabilidade na tolerância ao cobre, expressa pela concentração mínima inibitória em $\mu\text{g/ml Cu}^{++}$, dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* coletados entre os anos de 1998 e 2006.

Tabela 9. Porcentagem do número médio de colônias^a de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* observado em meio MMCC contendo sulfato de cobre em diferentes concentrações em relação ao meio sem cobre.

Isolados		Cu ⁺⁺ (µg/ml)				
		10	20	30	40	50
1	NCPPB 2475	0	0	0	0	0
2	UnB 1183	88	33	25	0	0
3	IBSBF 1369	65	52	23	0	0
4	IBSBF 1385	97	75	13	0	0
5	UnB 1190	69	29	0	0	0
6	UnB 1204	87	6	0	0	0
7	UnB 1205	56	0	0	0	0
8	UnB 1216	27	23	0	0	0
9	UnB 1212	92	59	0	0	0
10	UnB 1222	87	17	0	0	0
11	UnB 1292	97	88	48	1	0
12	UnB 1293	76	0	0	0	0
13	UnB 1294	87	81	60	0	0
14	UnB 1295	93	58	0	0	0
15	UnB 1298	87	82	75	62	0
16	UnB 1299	99	91	89	89	16
17	UnB 1301	95	91	72	58	0
18	UnB 1310	81	67	61	0	0
19	UnB 1314	93	82	4	0	0
20	UnB 1316	84	76	1	0	0
21	UnB 1318	84	83	7	3	0

^a média de três repetições

No tratamento com oxiclreto de cobre (**Tabela 10**) a CMI também variou entre 10 e 60 $\mu\text{g/ml}$. Novamente a estirpe tipo NCPPB 2475 foi a única que não apresentou crescimento na menor concentração, de 10 $\mu\text{g/ml}$. Com 20 $\mu\text{g/ml}$ somente o isolado UnB 1295 se mostrou sensível ao cobre. Apresentaram uma CMI de 30 $\mu\text{g/ml}$ as estirpes UnB 1183, IBSBF 1385, UnB 1190, UnB 1204, UnB 1205, UnB 1212, UnB 1222 e os isolados UnB 1293, UnB 1294 e UnB 1298. A partir de 40 $\mu\text{g/ml}$ o número de colônias foi reduzido, sendo que os isolados UnB 1216, UnB 1299, UnB 1301 e UnB 1318 mostraram-se sensíveis nessa concentração. Apresentaram uma CMI de 50 $\mu\text{g/ml}$ somente UnB 1292 e UnB 1310. A estirpe IBSBF 1369 e os isolados UnB 1314 e UnB 1316 apresentaram uma concentração mínima inibitória de 60 $\mu\text{g/ml}$.

Com relação à distribuição dos isolados nas áreas de coleta (**Tabela 11**), observou-se que isolados coletados na mesma localidade diferiram quanto a CMI. Por exemplo, no estado da Bahia a tolerância ao íon variou nas quatro diferentes áreas amostradas para ambos os produtos testados, sendo que a tolerância observada com oxiclreto foi maior do que com sulfato de cobre. No estado do Piauí, a única área de coleta mostrou uma variação de tolerância quanto aos produtos testados. No estado de Pernambuco, no Projeto Senador Nilo Coelho, a tolerância ao íon manteve-se uniforme. No restante das áreas amostradas a tolerância variou tanto entre áreas quanto entre os produtos testados, exceto na Fazenda Vale das Uvas em que a tolerância manteve-se uniforme em 30 $\mu\text{g/ml}$ com o oxiclreto de cobre e nos isolados coletados em Petrolina, em que a faixa de tolerância manteve-se entre 40 e 60 $\mu\text{g/ml}$. No isolado coletado em Minas Gerais, a partir de mudas mantidas em viveiro, a tolerância ao cobre variou entre 40 e 50 $\mu\text{g/ml}$.

A mesma diferença observada entre as áreas de coleta foi observada com relação a distribuição dos isolados nos anos de coleta. Por exemplo, para sulfato de cobre, os isolados com CMI maior que 50 $\mu\text{g/ml}$ foram coletados a partir de 2003 (**Tabela 11**). Entretanto, para oxiclreto de cobre a CMI maior que 50 $\mu\text{g/ml}$ já é observada dois anos antes, em 2001.

Tabela 10. Porcentagem do número médio de colônias^a de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* observado em meio MMCC contendo oxiclureto de cobre em diferentes concentrações em relação ao meio sem cobre.

Isolados		Cu ⁺⁺ (µg/ml)				
		10	20	30	40	50
1	NCPPB 2475	0	0	0	0	0
2	UnB 1183	89	0	0	0	0
3	IBSBF 1369	78	64	25	14	4
4	IBSBF 1385	81	32	0	0	0
5	UnB 1190	65	29	0	0	0
6	UnB 1204	90	29	0	0	0
7	UnB 1205	88	52	0	0	0
8	UnB 1216	46	34	0	0	0
9	UnB 1212	40	14	0	0	0
10	UnB 1222	90	46	0	0	0
11	UnB 1292	95	75	47	28	0
12	UnB 1293	81	46	0	0	0
13	UnB 1294	90	85	0	0	0
14	UnB 1295	98	0	0	0	0
15	UnB 1298	71	49	0	0	0
16	UnB 1299	89	80	44	0	0
17	UnB 1301	65	53	34	0	0
18	UnB 1310	46	4	3	1	0
19	UnB 1314	68	63	57	52	6
20	UnB 1316	72	56	49	42	18
21	UnB 1318	84	33	25	0	0

^a média de três repetições

Tabela 11. Sensibilidade ao cobre em *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* expressa em CMI^a ($\mu\text{g/ml}$ de Cu^{++}), comparando-se áreas de coleta.

Isolados	Origem	Local de coleta	Ano de Coleta	CMI CuSO_4	CMI $\text{Cu}_2(\text{Cl}(\text{OH})_3$	
1	NCPPB 2475	Anab-e-Shahi	Índia	1972	10	10
2	IBSBF 1385	cv.Itália	Teresina – PI	1998	40	30
3	UnB 1204	cv.Red Globe	Projeto Maniçoba, Juazeiro – BA	1999	30	30
4	UnB 1205	cv.Itália	Faz. Labrunier, Sobradinho – BA	2000	20	30
5	UnB 1292	cv.Red Globe	Projeto Mandacaru, Juazeiro – BA	2003	50	50
6	UnB 1316	cv.Red Globe	Faz. PECEL, Juazeiro – BA	2005	30	60
7	UnB 1190	cv.Red Globe	Projeto Senador Nilo Coelho – PE	1998	40	30
8	UnB 1212	cv.Itália	Projeto Senador Nilo Coelho – PE	2001	40	30
9	UnB 1294	cv.Thompson x Paulsen	Faz. Boa Esperança, Petrolina – PE	2003	20	30
10	UnB 1314	cv.Red Globe	Faz. Boa Esperança, Petrolina – PE	2005	50	60
11	UnB 1216	cv.Red Globe	Projeto Bebedouro, Petrolina – PE	2000	40	40
12	UnB 1222	cv.Perlette	Projeto Bebedouro, Petrolina – PE	2001	30	50
13	UnB 1295	cv.Festival	Projeto Bebedouro, Petrolina – PE	2004	30	20
14	UnB 1298	cv.Itália	Projeto Bebedouro, Petrolina – PE	2004	50	30
15	UnB 1183	cv.Red Globe	Faz. Vale das Uvas – PE	1998	40	30
16	UnB 1293	cv.Superior x IAC 766	Faz. Vale das Uvas – PE	2003	20	30
17	UnB 1310	cv.Festival	Faz. Frutirenda, Petrolina – PE	2005	40	50
18	UnB 1299	cv.Thompson	Faz. MARIAD, Petrolina – PE	2004	60	40
19	IBSBF 1369	cv.Red Globe	Petrolina – PE	1998	40	60
20	UnB 1301	cv.Thompson	Petrolina – PE	2004	50	40
21	UnB 1318	cv. BRS – Morena	Caldas – MG	2006	50	40

^aCMI: concentração mínima inibitória, observada em meio MMCC.

3.2- Metodologia 2

Utilizando a metodologia utilizada por Araújo (2001) para *Xcv*, através da qual avaliou-se a tolerância ao cobre pela presença ou ausência de colônias em cada repetição. Observou-se que a tolerância ao cobre nos sete isolados avaliados variou de 0 a 350 µg/ml (Tabela 12). A estirpe tipo NCPPB 2475, a estirpe IBSBF 1385 e o isolado UnB 1301 não apresentaram tolerância ao cobre na faixa de concentração testada. O isolado UnB 1292 mostrou tolerância até 200 µg/ml, UnB 1299 até 250 µg/ml e o isolado UnB 1301 apresentou a maior tolerância ao cobre entre os isolados testados, de 350 µg/ml.

Tabela 12. Níveis de tolerância de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* cobre *in vitro*, segundo metodologia utilizada por Araújo (2001), em meio NA.

Isolado	Data de Coleta	Cultivar	Procedência	Tolerância (µg/ml de Cu ⁺⁺) ^{a,b}
NCPPB 2475	1972	Anab-e-Shahi	Índia	0
IBSFS 1385	1998	Itália	Teresina – PI	0
UnB 1292	2003	Red Globe	Juazeiro – BA	200
UnB 1298	2004	Itália	Petrolina – PE	0
UnB 1299	2004	Thompson	Petrolina – PE	250
UnB 1301	2004	Thompson	Petrolina – PE	0
UnB 1318	2006	BRS-Morena	Caldas – MG	350

^a Sulfato de cobre

^b Concentração máxima em que houve crescimento

3.3- Detecção e caracterização de seqüências do gene *copA* em *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*

3.3.1- Análise com os primers *copA*

Amplificações com os “primers” desenhados a partir de seqüências do gene *copA* de *X.a.citri* e *X.c.campestris* (**Figura 15**) foram observadas para todos os isolados de *Xcv* testados, produzindo inicialmente três fragmentos de aproximadamente 2 kb, 900 pb, 600 e 500 pb.

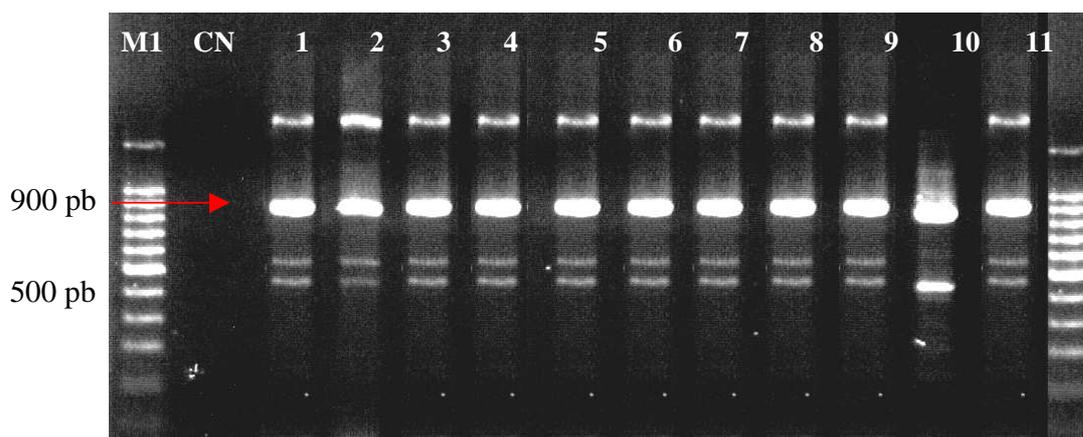


FIGURA 15. Eletroforese em gel de agarose a 1 % dos produtos de PCR obtidos com os “primers” *copAL* – *copAR* com DNA de diferentes isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*: (CN) Controle Negativo; (1) NCPPB 2475;(2) UnB 1302; (3) UnB 1303; (4) UnB 1304; (5) UnB 1305; (6) UnB 1306; (7) UnB 1307; (8) UnB 1308; (9) UnB 1309; (10) UnB 1310; (11) UnB 1311. M1 e M2 – Marcador 100 pb DNA – Ladder (Gibco-BRL).

3.3.2- Análise das seqüências

A partir da amplificação do gene *copA* de *X.c.campestris* e *X.a.citri* apenas os produtos de aproximadamente 900 pb foram utilizados para o sequenciamento, sendo os produtos inespecíficos eliminados, conforme citado anteriormente no item 2.4.2. Após o sequenciamento, somente para a estirpe tipo NCPPB 2475 e os isolados UnB 1292, UnB 1295 e UnB 1318 obteve-se seqüências de alta qualidade.

Estas seqüências foram comparadas através do programa BLAST que mostrou alta similaridade do produto de PCR detectado em *Xcv* com o gene *cop* de vários isolados bacterianos presentes no GenBank (**Tabela 13**).

Tabela 13. Comparação (NCBI – BLAST) do gene *copA* seqüenciado de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* com seqüências depositadas no GenBank.

Acesso	Descrição das estirpes	Grau de identidade
AE012013.1	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> strain 306	98 %
AM039952.1	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	94 %
AP008229.1	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> MAFF 311018	89 %
AE013598.1	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> KACC10331	89 %
AE012155.1	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> strain ATCC 33913	80 %
CP000050.1	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> strain 8004	80 %

Após o alinhamento das seqüências dos isolados de *Xcv* com as seqüências do gene *copA* de *X.c.campestris* strain ATCC 33913, *X.a.citri* strain 306 e *X. oryzae* pv. *oryzae* strain KACC10331, como grupo externo, uma árvore filogenética foi construída. A árvore filogenética gerada (**Figura 16**) mostrou um grupo englobando os isolados de *Xcv* NCPPB 2475, UnB 1218, UnB 1292 e UnB 1295 e *X.a.citri*, mais distantes de *X.c.campestris* e de *X.o.oryzae*.

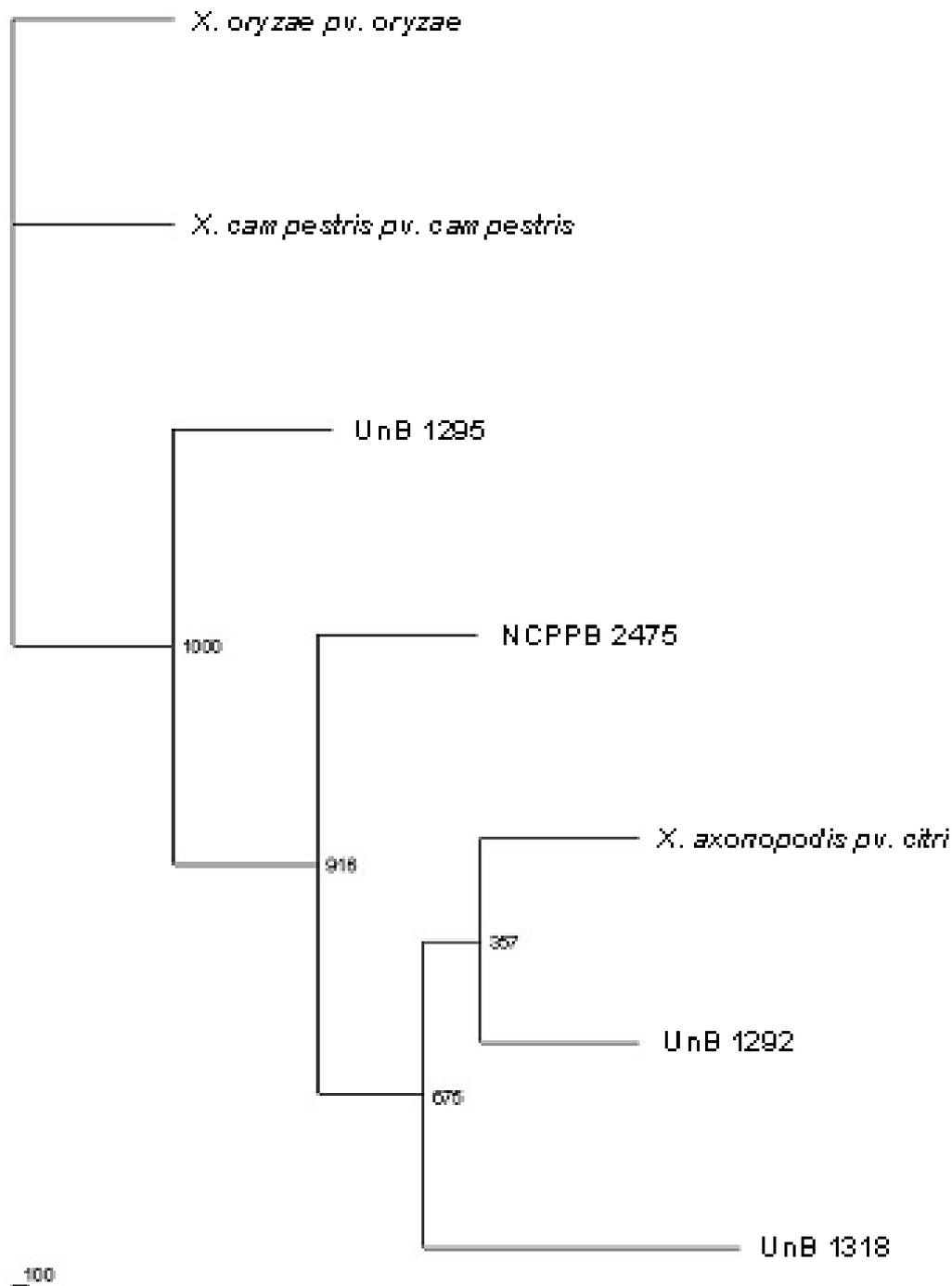


Figura 16. Árvore filogenética obtida por Consensus Tree a partir do sequenciamento do gene *copA* de *X. campestris* pv. *viticola* e seqüências depositadas no GenBank de *X. campestris* pv. *campestris* NC 33913, *X. axonopodis* pv. *citri* NC 003919 e *X. oryzae* pv. *oryzae* AE013598.1.

4- DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo confirmam aqueles já relatados anteriormente, de que as estirpes brasileiras de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* apresentaram variabilidade na tolerância ao cobre e que esta tolerância ocorre naturalmente nas regiões produtoras. Araújo (2001) mostrou que essas estirpes mais tolerantes ocorrem na região de Petrolina, e no presente trabalho, demonstrou-se que também ocorrem em outras áreas como Bahia e Piauí. Segundo Romeiro (1995), em alguns casos, toda a população bacteriana já é naturalmente resistente a um ou vários antibióticos, o que também pode observado em relação aos compostos cúpricos.

A ocorrência de estirpes tolerantes de *Xcv* pode ser explicada pela introdução de estirpes já resistentes, através de material propagativo infectado da Índia, uma vez que Chand *et al.* (1994) já observaram uma alta resistência ao cobre em isolados de *Xcv* naquele país. Dessa forma, o uso freqüente de compostos cúpricos na região do Vale do São Francisco pode ter levado a um caso típico de pressão de seleção sobre a população bacteriana, que transmitiu essa resistência à progênie (Romeiro, 1995).

A tolerância ao cobre observada neste trabalho reforça a hipótese levantada para o patossistema de *X. vesicatoria* em pimentão e tomate, em que isolados tolerantes eram disseminados através de material propagativo para diferentes áreas, implicando na expansão e estabelecimento dessas populações. Outro fator a ser considerado que também pode estar associado a este processo seria a transferência conjugativa (Cooksey, 1990), onde as bactérias são capazes de trocar material genético entre si, gerando variabilidade por recombinação genética. Esta transferência pode ocorrer tanto entre plasmídeos como entre parte de cromossomos bacterianos (Romeiro, 1995).

Novamente fica colocada em questão a provável futura ineficiência do uso exclusivo e excessivo dos produtos cúpricos no controle do cancro bacteriano da videira (Araújo, 2001), já que esses produtos são recomendados para aplicação preventiva (Malavolta Jr. *et al.*, 1999). O presente trabalho e outros relatos como os de Chand *et al.* (1991), Chand *et al.* (1992), Chand *et al.* (1994), Lima & Mashima (2000) e Araújo *et al.* (2003) indicam que a resistência ao metal está presente nas estirpes no Brasil e Índia.

A ocorrência do aumento na tolerância aos íons de cobre em *Xcv* ao longo dos anos também reflete o ocorrido em outros grupos de bactérias tais como: *X. vesicatoria* na Flórida, EUA (Marco & Stall 1983) e no Brasil (Aguiar *et al.* 2003; Quezado – Duval *et al.*, 2003 e Carmo *et al.*, 2001) e em *P. tomato* na Califórnia, EUA (Cooksey, 1990) e no Brasil (Silva & Lopes, 1995), onde os produtos cúpricos e cuprorgânicos quando aplicados isoladamente não foram mais eficazes no controle desses patógenos.

A variabilidade na tolerância encontrada entre e dentre áreas de coleta sugere novamente que houve uma disseminação das estirpes mais tolerantes por meio de material propagativo para esses diferentes locais ou mesmo uma reação local das estirpes, ocasionada pela pressão de seleção devido às aplicações excessivas de produtos a base de cobre. Essa ocorrência reflete uma das hipóteses levantadas por Trindade *et al.* (2005) para a diversidade genética encontrada entre isolados de *Xcv*, onde os autores levantam a possibilidade de que ocorreu uma única introdução de onde o patógeno foi disseminado para outras áreas produtoras no Vale do São Francisco.

É importante ressaltar que os resultados de testes de tolerância *in vitro* aos íons de cobre são muito variáveis, pois dependem da escolha do meio de cultura, já que muitos deles complexam o cobre, como observado por Silva & Lopes (1995). A resistência de isolados de *P. tomato* variou sensivelmente quando utilizados diferentes meios: King's B, NA, 523 e MMCC. O mesmo foi observado por Rezende (2006), nos meios 523 e MMCC, para *Erwinia psidii*.

No estudo em questão foi utilizado o meio MMCC, caracterizado pela baixa formação de complexos com o cobre e como comparação à metodologia utilizada por Araújo (2001) para estudos de tolerância ao cobre em *Xcv*. Os níveis de tolerância (expressos em CMI) observados nos isolados estudados variaram entre 0 e 50 µg/ml para ambos os produtos utilizados e não foram tão altos quanto os relatados por Chand *et al.* (1994, na Índia, citado por Araújo (2001), que variaram entre 600 e 1800 µg/ml, e por Araújo (2001) que variaram entre 50 e 300 µg/ml. Utilizando metodologia semelhante, na qual incorporava-se o cobre ao meio MMCC, Rezende (2006) observou uma tolerância de até 30 µg/ml de Cu⁺⁺ para o sulfato de cobre e de até 50 µg/ml de Cu⁺⁺ para o oxiclreto de cobre em isolados de *Erwinia psidii*.

Corroborando os resultados de tolerância *in vitro* aos íons cobre verificou-se que o gene *copA* parece já estar expandido e estabelecido nas populações bacterianas, uma vez que foi possível obter amplificação positiva com os “primers” correspondentes ao gene *copA* de *X. campestris* pv. *campestris* e *X. axonopodis* pv. *citri* para todos os 37 isolados de *Xcv* testados. A estirpe tipo de *Xcv*, NCPPB 2475 da Índia, não mostrou tolerância ao metal, mas apresentou o respectivo gene que confere resistência. Da mesma forma, em *P. syringae* da manga, tanto isolados sensíveis quanto tolerantes ao metal carregavam plasmídeos homólogos ao *copABCD* (Carzola *et al.*, 2002). É possível, portanto, que o gene não esteja sendo expresso nessa estirpe (NCPPB 2475). Considerando que esta foi coletada em 1972, ano do primeiro relato da doença na Índia, é possível que naquela época não fosse necessário ainda o uso extensivo de compostos cúpricos para o controle da doença.

A alta homologia entre os produtos das amplificações com os “primers” *copAR* e *copAL* a partir do DNA dos isolados de *X. campestris* pv. *viticola* com o gene *copA* de *X. campestris* pv. *campestris* e *X. axonopodis* pv. *citri*, confirmou a existência do gene em *Xcv*. A árvore filogenética gerada com alta reprodutibilidade mostrou maior distância de *Xcv* em relação a *X. oryzae* pv. *oryzae* e *X. campestris* pv. *campestris* e maior proximidade com *X. axonopodis* pv. *citri*. Este fato pode ser um indicativo de maior afinidade de *X. campestris* pv. *viticola* com a espécie *X. axonopodis* do que com *X. campestris*, confirmando as observações de Takita *et al.* (2004) em trabalho analisando a região *rpf*.

Entre os quatro isolados que tiveram os produtos de PCR sequenciados, a estirpe tipo NCPPB 2475 foi a que mostrou menor tolerância ao cobre, seguido de UnB 1295, UnB 1292 e UnB 1318. Mesmo dentro do agrupamento que incluiu os isolados de *X. campestris* pv. *viticola* e *X. axonopodis* pv. *citri* a árvore filogenética formou ramificações nas quais a estirpe mais sensível NCPPB 2475 foi agrupada mais próxima do isolado UnB 1295 que também se mostrou mais sensível com relação aos demais, UnB 1292 e UnB 1318, que apresentaram maior tolerância aos íons metálicos de cobre.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL. FNP. São Paulo. 2005. pp. 531-520.

AGUIAR, I.F.; SILVA, V.A.V.; CASTRA, G.S.S.; NASCIMENTO, A.R.P. & PAZ, C.D. Resistência a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em cultivares de videira no Vale do São Francisco. **Fitopatologia Brasileira** 26: (Suplemento). 2001. p.282

AGUIAR, L.A.; KIMURA, O.; CASTILHO, K.S.C.; RIBEIRO, R.L.D.; AKIBA, F.; CARMO, M.G.F. Efeito de formulações cúpricas e cuproorgânicas na severidade da mancha bacteriana e na população de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em pimentão. **Horticultura Brasileira** Brasília 21 (1): 44-50. 2003.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology** 215 (3): 403-410. 1990.

AMORIM, L. & KUNIYUKI, H. **Doenças da videira**. In: Kimati *et al.* (Eds.) Manual de fitopatologia – Doenças de plantas cultivadas. São Paulo. Agronômica Ceres. 2005. pp. 639-651.

ANDREI, E. **Compêndio de defensivos agrícolas**. Andrei, E. (Ed). 7^a ed. São Paulo. ANDREI. 2005.

ARAÚJO, J.S.P.; ROBBES, C.F. & MACIEL, G.F. Novos hospedeiros alternativos de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* no Brasil. **Summa Phytopathologica** 25 (1): 83. 1999.

ARAÚJO, J.S de 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. UFRJ. 2001.

ARAÚJO, J.S.P.; OLIVEIRA, B.C.; GONÇALVES, K.S.; CASTILHO, A.M.C.; RIBEIRO, R.L.D. & ROBBS, C.F. Resistência ao cobre em estirpes brasileiras de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira** 28: (Suplemento). 2003. p. 339.

ARAÚJO, J.S. OLIVEIRA, B.C. de; OLIVARES, F.L.; REIS JUNIOR, F.B. dos; CRUZ, G.B. ROBBS, C.F. & RIBEIRO, R. de. L.D. Imunomarcção de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* com ouro utilizando anticorpos policlonais. **Agronomia** 38: 29-33. 2004.

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

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**. London. John Wiley & Sons. 2nd ed. 1992.

BARAK, J.D. & GILBERTSON, R.L. Genetic diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* the causal agent of bacterial leafspot of lettuce. **Phytopathology** 93 (5): 596-603. 2003.

BASIM, H.; MINSAVAGE, G.V.; STALL, R.E.; WANG, J.F.; SHANKER, S. & JONES, J.B. Characterization of a unique chromosomal copper resistance gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Applied and Environmental Microbiology** 71: 8284-8291. 2005.

BATISTA, M. de F. Métodos moleculares para identificação de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas** 1: 165-196. 1993.

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* L.). **Anais do Congresso de Iniciação Científica da Universidade de Brasília** 80. 2000.

CAMARGO, M.G.F.; MACAGNAN, D.; CARVALHO, A.O. Progresso da mancha-bacteriana do pimentão a partir de diferentes níveis iniciais de inóculo e do emprego ou não do controle com oxicleto de cobre. **Horticultura brasileira** 19 (3): 342-347. 2001.

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/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=16772>) Bento Gonçalves– RS. 2003. p.170.

CARZOLA, F.M.; ARREBOLA, E.; SESMA, A.; CODINA, J.C.; MURILLO, J. & VICENTE, A. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* strains isolated from mango is encoded mainly by plasmids. **Phytopathology** 92: 909-916. 2002.

CHAND, R.; PATIL, B.P. & KISHUM, R. Management of bacterial canker disease (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*) of grape vine (*Vitis vinifera*) by pruning. **Indian Journal of Agricultural Sciences** 61: 220-222. 1991.

CHAND, R. Sources of resistance to grapevine bacterial canker disease in *Vitis*. **Vitis** 31: 83-86. 1992.

COOKSEY, D.A. Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology** 28: 201-219. 1990.

COOKSEY, D.A. & AZAD, H.R. Accumulation of copper and other metals by copper-resistant plant-pathogenic and saprophytic *Pseudomonads*. **Applied and Environmental Microbiology** 58: 274-278. 1992.

COSTERTON, J.W; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R. & LAPIN-SCOTT, H.M. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology** 49: 711-745. 1995.

De BRUIJN, F.J. Use repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) sequences and polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium melilot* isolates other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology** 58: 2180-2187. 1992

De BRUIJN, F.J.; RADEMAKER, J.; SCHNEIDER, M.; ROSSBACH, R. & LOUWS, F.J. rep-PCR Genomic Fingerprinting of Plant-Associated Bacteria and Computer-Assisted Phylogenetic Analyses. Stacey, G, Mullin, B & Gresshoff, P. (Eds) In: **Biology of Plant-Microbe Interaction. Proceedings of the 8th International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions**. APS Press. 1996. pp. 497-502.

DIAS, L.A. dos S. **Análises Multidimensionais**. In: ALFENAS, A.C. (Ed.) Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins, fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. UFV. 1998. pp. 404-407.

DOMBEK, P.E.; JOHNSON, L.K.; ZIMMERLEY, S.T. & SODOWSKY, M.J. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. **Applied and Environmental Microbiology** 66: 2572-2577. 2000.

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. **Agricultural Research** 21: 153-177. 1978.

ERWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C. & GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces 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 abr. 2007.

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

FERREIRA, M. & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RADP e RFLP em análise genética**. Brasília: EMPRAPA-CENARGEN. 1995.

FERREIRA, H.B. **Organização gênica de procariotos**. In: *Biologia Molecular Básica*. Arnaldo, Z., Henrique B. Ferreira & Luciene, M. P. Passaglia (Eds). 3^a Ed. Porto Alegre. Mercado Aberto. 2003. pp. 322-327.

FREIRE, F. das C.O. & OLIVEIRA, A.D.S. de. **Ocorrência do cancro bacteriano da videira no estado do Ceará**. Comunicado Técnico-EMBRAPA. Fortaleza-CE, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2001. 2p.

GARDER, S. & BENDER, C.L. DNA probes for detection of copper resistance genes in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Applied and Environmental Microbiology** 57: 2435-2439. 1991.

GARRITY, G.M.; BRENER, D.J. & STALEY, J.T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2ed. Garrity, G. M. (Ed). V. Springer. 2005.

GAVA, C.A.T. Manejo integrado de doenças de fruteiras no Semi-Árido do Submédio do Vale São Francisco. **Fitopatologia Brasileira**: (Suplemento) 31. 2006. S19.

GENT, D.H.; SCHUARTZ, H.F.; ISHIMARU, C.A. & LOUWS, F.J. Polyphasic characterization of *Xanthomonas* strains from onion. **Phytopathology** 94 (2): 184-195. 2004.

GILSON, E. PERRIN, D. & HOFNUNG, M. DNA polymerase I and protein complex bind specifically to *E. coli* palindromic unit highly repetitive DNA: implications for bacterial chromosome organization. **Nucleic Acids Research** 18: 3941-3952. 1990.

HALFELD-VIEIRA, B.A. & NECHET, K. de L. Bacterial Canker of Grapevine in Roraima, Brasil. **Fitopatologia Brasileira** (Notas Fitopatológicas) 31 (6): 6098. 2006.

HEIMAN, M. **Webcutter 2.0** (1997). (Disponível URL: <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>). Consultado em 10 mar. 2007.

HIGGNINS, C.F.; AMES, G.F-L; BARNES, W.M.; CLEMENT, J.M. & HOFNUNG, M.A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons. **Nature** 298: 760-762. 1982.

HILLIS, D.M. & BULL, J.J. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. **Systematic Biology** 42: 182-192. 1993.

HORITA, M. & TSUCHIYA, K. Genetic diversity of japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. **Phytopathology** 91: 399-407. 2000.

HUGH, R. & LEIFSON, E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. **Journal of Bacteriology** 66: 24-26. 1953.

HULTON, C.S.J.; HIGGINS, C.F. & SHARP, P.M. Eric sequences: a novel family of repetitive elements in the genome of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and the other enterobacteria. **Molecular Microbiology** 5: 825. 1991.

INSTRUÇÃO NORMATIVA SDA nº 38, 1998. Ministério da Agricultura e Abastecimento. (Disponível URL: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=723>). Consultado em 22 jan. 2007.

INSTRUÇÃO NORMATIVA nº 09, 2006. Ministério da Agricultura e Abastecimento. (Disponível URL: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=16772>). Consultado em 10 jan. 2007.

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.

JUDD, A.K.; SCHNEIDER, M.; SADIWSKY, M.J. & DE BUIJN, F.J. de. Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. **Applied and Environmental Microbiology** 59: 1702-1708. 1993.

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

KAUR, B.; PURKAYASTHA, S.; DILBACHI, N. & CHAUDHURY, A. Characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *cymopsidis*, the bacterial blight pathogen of cluster bean using PCR-based molecular markers. **Phytopathology** 153: 470-479. 2005.

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

KOEUTH, T., VERSALOVIC, J. & LUPSKI, J.R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. **Genome Research** 5: 408-418.1995.

LEÃO, P.C. de S. **Principais variedades**. In: Leão, P.C. de S & Soares, J.M.S. (Eds). A viticultura no Semi-Árido brasileiro. Petrolina – PE. Embrapa Semi-Árido. 2000. pp. 45-63.

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 Semi-Árido. 2000. pp. 13-32.

LEE, Y.A., HENDSON, M., PANOPOULOS, N.J. & SCHROTH, M. Molecular cloning, chromosomal mapping, and sequence analysis of copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* : homology with small blue copper proteins and multicopper oxidase. **Journal of Bacteriology** 176: 173-188. 1994.

LELLIOT, R.A. & STEAD, D.E. Methods for diagnosis of bacterial diseases plants. In: LELLIOT, R.A. & STEAD, D.E. (Eds). **Methods in plant pathology**. Oxford Blackwell Science 2: 216. 1987.

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

LIMA, M.F. & MOREIRA, W.A. **Uva de mesa: Fitossanidade (Frutas do Brasil)**. Doenças causadas por bactérias. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 2002

LIMA, M.F.; FERREIRA, M.A.S.V.; MOREIRA, W.A. & DIANESE, J.C. Bacterial canker fo grapevine in Brazil. **Fitopatologia Brasileira** 24: 440-443. 1999.

LIMA, M.F. & MASHIMA, C. Tratamento térmico e térmico de bacelos de videira infectados com *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira** 25: (Suplemento). 2000. p.324

LOPES, D.B. Manejo sustentável de fitobacteriose: Cancro bacteriano da videira (Mesa Redonda). **Fitopatologia Brasileira** 31: (Suplemento). 2006. S83.

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 Semente no Vale do São Francisco. Junho, 2004. Petrolina: Embrapa Semi-Árido. (Documentos 185).

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

LOUWS, F.J.; FULBRIGHT, D.W.; STEPHENS, C.T. & DE BRUIJN, F.J. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology** 85 (5): 528-536. 1995.

LOUWS, F.J.; FULBRIGHT, D.W.; STEPHENS, C.T. & DE BRUIJN, F.J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* e *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and Environmental Microbiology** 60: 2286-2295. 1994.

LOZANO, J. & SEQUEIRA, L. Differentiation of races of *Pseudomonas solanaceum* by leaf infiltration technique. **Phytopathology** 60: 833-838. 1970.

MAES, M.; GARBEVA, P. & EKAMOEN, 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.; SUGIMORI, M.H.; RIBEIRO, I.J.A.; RODRIGUES NETO, J. & NOGUEIRA, E.M.C. *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* no estado do Piauí. **Summa Phytopathologica** 25: 89. 1995a.

MALAVOLTA JR. V.A.; ALMEIDA, I.M.G. & RODRIGUES NETO, J. Ação *in vitro* de alguns bactericidas sobre *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Summa Phytopathologica** 25: 88. 1995b.

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. 1999.

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

MANCEAU, C. & HORVAIS, A. Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of rRNA operons with special emphasis on *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **Applied and Environmental Microbiology** 63 (2): 498-505. 1996.

MARCO, G.M. & STALL, R.E. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensibility to copper. **Plant Disease** 67: 779-781. 1983.

MARQUES, A.S.A & FONSECA, F.C. *Xylophilus ampelinus*: **Bactéria quarentenária com risco para a cultura da videira no Brasil**. Comunicado Técnico-EMBRAPA. Brasília – DF, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 7p. 2005.

MARTIN, B; HUNBERT, O. CAMARA, M.; GUENZI, E.; WALKER, J.; MITCHELL, T.; ANDREW, P.; PRUDHOMME, M.; ALLOING, G.; HAKENBECK, R.; MARRISON, D.A.; BOULNOIS, G.J. & CLAVERY, J-P. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research** 20 (13): 3479-3483. 1992.

MOREIRA, W.A.; PEREIRA, A.V.S.; KARASAWA, M & ANTUNES JR., E.F. Efeito de inoculações artificiais de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em plantas de neem. **Fitopatologia Brasileira** 31: (Suplemento). S282. 2006.

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: (Suplemento). 2000. p. 326

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

NASCIMENTO, A.R.P.; MARIANO, R.L.R. & GAMA, M.A.S. Métodos de preservação e crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em meio de cultura variando temperatura, pH e concentração de NaCl. **Fitopatologia Brasileira** 30: 650-654. 2005a.

NASCIMENTO, A.R.P.; MICHEREFF, S.J.; MARIANO, R. de L.R. & GOMES, A.M.A. Elaboração e validação de escala diagramática para cancro bacteriano da videira. **Summa Phytopathologica** 31: 59-64. 2005b.

NASCIMENTO, A.R.P. & SILVA, Z.E. Efeito de agroquímicos sobre a bactéria do cancro da videira. **Fitopatologia Brasileira** 24: (Suplemento). p.252. 1999.

NAYUDU, M.V. *Pseudomonas viticola* sp. nov. incitant of a new bacterial disease of grapevine. **Phytopathology** 73: 183-86. 1972.

NCBI – BLAST. National center for biotechnology information. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=58424217&from=769525&to=771441&view=gbwithparts>). Consultado em 18 abr. 2007.

OPGENORTH, D.C.; SMART, C.D.; LOUWS, F.J.; DE BRUIJIN, F.J. & KIRKPATRICK, B.C. Identification of *Xanthomonas fragariae* field isolates by PCR genomic fingerprinting. **Plant Disease** 80 (8): 868-873. 1996.

PEIXOTO, A.R.; MARIANO, R.L.R. & MOREIRA, J.O.T. Hospedeiros alternativos de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira** 31: (Suplemento). 2006. S250.

POHRONEZNY, K; SOMMERFELD, M. & RAID, R.N. Streptomycin resistance and copper tolerance among strain of *Pseudomonas cichorii* in commercial celery seedbeds. **Phytopathology** 82 (Abstract): 1118. 1992.

POMMER, G.V. & MAIA, M.L. **Introdução**. In: MANICA, I. (Ed.) Uva: Tecnologia de produção, pós-colheita, mercado. Porto Alegre. Editora Cinco Continentes. 2003. pp. 11-35.

QUEZADO-DUVAL, A.M.; GAZZOTO-FILHO, A.; LEITE JÚNIOR, R.P.; CAMARGO, L.E.A. Sensibilidade a cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em *Xanthomonas* spp. associadas a mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial. **Horticultura Brasileira** 21 (4): 670-675. 2003.

RADEMAKER, J.L.W.; NORMAN, D.J.; FOSTER, R.L.; LOUWS, F.J.; SCHULTS, M.H. & DE BRUIJN, F.J. Classification and identification of *Xanthomonas translucens* isolates including those pathogenic to ornamental asparagus. **Phytopathology** 96: 876-884. 2006.

RADEMAKER, J.L.W.; LOUWS, F.J.; SHULTZ, M.H.; ROSSBACH, U.; VOUTERIN, L.; SWINGS, J. & de BRUIJN, F.J. A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. **Phytopathology** 95: 1098-1111. 2005.

RADEMAKER, J.L.W.; HOSTE, B.; LOUWS, F.J.; KERSTERS, K.; SWINGS, J.; VAUTERIN, L.; VAUTERIN, P. & BRUIJN, F.J. de. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 50: 6650-677. 2000.

RAVERS, L.F. Biologia molecular e biotecnologia da videira – aplicações e potencialidades. **X Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia**, (Disponível URL: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/anais/cbve10/cbve10-palestra10.pdf>) Bento Gonçalves – RS. 2003. p.159.

REZENDE, A.M. de F.A. **Estudos sobre a resistência genética e produtos químicos no controle da bacteriose da goiabeira (*Psidium guajava*) causada por *Erwinia psidii***. (Dissertação de Mestrado). Brasília, DF. Universidade de Brasília. 2006.

ROBBS, C.F. & NETO, J.R. Enfermidades causadas por bactérias em frutíferas tropicais no Brasil. **Summa Phytopathologica** 25: 47-52. 1999.

ROMEIRO, R.S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa. UFV. 1995.

ROZEN, S. & SKALETSKY, H.J. **Primer 3**, 1998 (Disponível URL: <http://www.genome.wi.mit.edu/genome>). Consultado em abr. 2007.

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.

SCHAAD, N.W.; JONES, J.B. & LACY, G.H. *Xanthomonas*. In: Schaad, W.M. (Ed.) Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. St. Paul: The American Phytopathological Society. 2^o Ed. 1994. pp. 75-336.

SHARPLES, G.J. & LLOYD, R.G. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. **Nucleic Acids Research** 18: 6503-6508. 1990.

SILVA, V.L. & LOPES, C.A. Isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* resistentes a cobre em tomateiros pulverizados com fungicidas cúpricos. **Fitopatologia Brasileira** 20: 85-89. 1995.

SILVA, V.A.V.; AGUIAR, I.F.; CASTRO, G.S.S.; NASCIMENTO, A.R.P. & PAS, C.D. Ação *in vitro* de produtos químicos em relação a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira** 25: (Suplemento). 2000. p. 331.

SILVER, S. & PHUNG, L.T. Bacterial heavy metal resistance: New Surprises. **Annual Review of Phytopathology** 50: 753-789. 1996.

STALL, R.E. LOSCHKE, D.C. & JONES, J.B. Linkage of copper resistance and avirulence loci on a self-transmissible plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology** 73: 241-243. 1986.

STARR, M.P. & WEISS, J.E. Growth of phytopathogenic bacteria in synthetic asparagin medium. **Phytopathology** 33: 314-318. 1943.

STERN, M.J.; AMES, G.F.L.; SMITH, N.H.; ROBINSON, E.C. & HIGGINS, C.F. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell** 37: 1015-1026. 1984.

TAKITA, M.A.; SOUZA, A. de; BORGES, K.M.; COLETTA-FILHO, H.D.; MONGE, G.A.; DESTÉFANO, S.; RODRIGUES NETO, J. & MACHADO, M.A. Região *rpf* (regulação de fatores de patogenicidade) distingue espécies de *Xanthomonas*. **Fitopatologia Brasileira** 29: (Suplemento) 2004. S255.

TAVARES, S.C.C. de H; LIMA, M.F.; MOREIRA, W.A.; COSTA, V.S. de O. & LOPES, D.B. **Monitoramento de doenças da videira**. ISSN 1516-1633 Nº 163 – Embrapa Semi-Árido. Petrolina – PE, 2001. 14p.

TAVARES, S.C.C. de H. **Cultivo da videira – Principais doenças e alternativas de controle**, 2004. (Disponível URL: http://www.cpatsa.embrapa.br/sistema_producao/spvideira/doencas.htm. Consultado em 10 jan. 2007.

TEIXEIRA, A.H. de C. & AZEVEDO, P.V. de. Zoneamento agroclimático para a videira européia no Estado de Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Agrometeorologia** 4: 139-145. 1996.

TEIXEIRA, A.H. de C.; SOUZA, R.A. de; RIBEIRO, P.H.B.; REIS, V.C. da S. & SANTOS, M. das G.L. dos. Aptidão agroclimática da cultura da videira no estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** 6: 107-111. 2002.

TESSMANN, D.J.; VIDA, J.B. & LOPES, D.B. Novo Problema. **Cultivar** 5: 22-25. 2003.

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 choice. **Nucleic Acids Research** 22: 4673-4680. 1994.

TRINDADE, L.C. da. **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 brasilian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* by rep-PCR fingerprinting. **Fitopatologia Brasileira** 30: 46-54. 2004.

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.

VAUTERIN, L.; RADEMAKER, J. & SWINGS, J. Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. **Phytopathology** 90: 677-682. 2000.

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

VERA-CRUZ, C.M; ARDALES, E.Y; SKINNER, D.Z *et al.* Measurement of haplotypic variation in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* within a single field by rep-PCR and RFLP analyses. **Phytopathology** 86:1352-1359. 1996.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T. & LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research** 19: 6823-6831. 1991.

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

VOLOUDAKIS, A.E.; BENDER, C.L.; COOKSEY D.A. Similarity between copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* and *Pseudomonas syringae*. **Applied and Environmental Microbiology** 59: 1627-1634. 1993.

VOLOUDAKIS, A.E.; REIGNIER T.M.; COOKSEY D.A. Regulation of resistance to copper in *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. **Applied and Environmental Microbiology** 71: 782-789. 2005.

YANG, Y. & AMES, G.F-L. DNA gyrase binds to the family of prokaryotic repetitive extragenic palindromic sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 85: 8850-8854. 1988.

(ANEXOS)

TESTES BIOQUÍMICOS

Para a execução de todos os testes bioquímicos, os isolados foram cultivados por 48 – 72 h em meio 523 (modificado de Kado & Heskett, 1970), a 28 °C.

1- Teste de KOH

- Colônia bacteriana crescida por 72 h.
- KOH a 3 %
- Padrões para comparação utilizados *Rhathaybacter ratahay* (UnB 1132), Gram-positiva e *X. campestris* pv. *campestris* (UnB 159) (*X.c.campestris*), Gram-negativa.

2- Teste de Oxidação/Fermentação da glicose

- Meio O/F:
 - 1 g de dextrose
 - 100 mg de extrato de levedura
 - 200 mg de peptona
 - 0,5 ml de bromotimol ATN 1 %
 - 100 ml de água destilada
- Utilizou-se como padrão oxidativo *X.c.campestris* (UnB 159) e fermentativo *Erwinia chrysanthemi* (UnB 1028). Os tubos foram incubados por 3 dias.

3- Fluorescência em King's B

- Preparo de meio King's B modificado:

- 20 g de protease peptona
- 15 g de glicerina
- 1,5 g de K_2HPO_4
- 1,5 g de $MgSO_4$
- 18 g de Agar
- 1000 ml de água destilada
- Como padrão positivo foi utilizado *Pseudomonas fluorescens* (UnB 419) e *X.c.campestris* (UnB 159), como controle negativo.
- Incubou-se por 3 dias e a fluorescência foi observada sob luz UV.

4- Utilização de asparagina como fonte única de carbono e nitrogênio

- Preparo do meio de asparagina:
 - 1 g de asparagina
 - 50 mg de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
 - 50 mg de K_2HPO_4
 - 1,8 g de Agar
 - 100 ml de água destilada.
- Suspensão bacteriana foi preparada para cada um dos isolados
- Em cada placa foram testados 4 isolados.
- O crescimento bacteriano foi observado do 3º ao 7º dia após a inoculação.
- Como padrões foram utilizados: *Ralstonia solanacearum* (UnB 486), cujo crescimento foi positivo e *X.c.campestris* (UnB 159), que não apresentou crescimento.

5- Crescimento em meio TTC

- Preparo de Meio NA, contendo TTC:
 - 3 g de extrato de carne

- 5 g de peptona
- 15 g de Agar
- 1000 ml de água destilada
- TTC (Cloreto de Trifenil Tetrazólio) a 0,1 %.
- Padrão utilizado para comparação: *X.c.campestris* (UnB 159), cujo crescimento foi inibido nesta concentração de TTC.

6- Atividade da Catalase

- Adicionou-se algumas gotas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 20 volumes sobre uma lâmina na qual depositou-se uma alça de massa bacteriana.
- Padrão positivo utilizado foi: *X.c.campestris* (UnB 159).

Alinhamento das seqüências amplificadas com os “primers” *copAL* e *copAR* de *X. campestris* pv. *viticola*, *X. axonopodis* pv. *citri*, *X. campestris* pv. *campestris* e *X. oryzae* pv. *oryzae*, através do programa ClustalW. A identidade entre os nucleotídeos é representada por *.

Isolados	Seqüências
<i>X.a.citri</i>	-----
UnB_1318	-----CAACCTG-CCGACTGGTCACGGCTGTCAT-CCGGACG-----
NCPBP_2475	-----
UnB_1292	-----CTACACC-TACCTGCTCACACGGCGTGGCACC GGCCG-----
UnB_1295	-----CAACACG-CCTACTGTTCA-CTGCTGTCTCCCCGACG-----
<i>X.c.campestris</i>	TCATGCCCTCCACCCGCACTTCGCGCATCATGCCCGCTTCCATGTGGTAGAGCAGATGGCA
<i>X.o.oryzae</i>	TCATGCTTCCACCCGCACTTCGCGCATCATGCCCGCTTCCATGTGGTACAGCAGATGGCA
<i>X.a.citri</i>	-----
UnB_1318	GCAATTGGACCG-GCTT-TTCCAACCCGGCGAGAAGGTG----CTGCTGCGTTTCATCAA
NCPBP_2475	-----
UnB_1292	GCAATTGGACCGGACTTGTTCAAACCCGGCGAGAAGGTG----CTGCTGCGTTTCATCAA
UnB_1295	GACATTGGACCGGCTTCCCACCTCCCCGCGCAGAATGTG----CTGCTGCGTTTCATCGC
<i>X.c.campestris</i>	GTGGTAGGCCAGCGGCCAGCGCATCGGCGGTACGCGGTAGCTGCGGCGTTCGCCGG
<i>X.o.oryzae</i>	GTGATACGCCAGCGACCGAGCGCGTTCGCCGAGCACGCGGTAGGTGCGGGGTGCCGGG
<i>X.a.citri</i>	TGGCT--CGTCGATG-----ACCTACTTCGACATCCGTATC-
UnB_1318	TGGCT--CGTCGATG-----ACCTACTTCGACATCCGTATC-
NCPBP_2475	TGGGT--CGTCGATG-----ACCTACTTCGACATCCGTATC-
UnB_1292	TGGCT--CGTCGATG-----ACCTACTTCGACATCCGTATC-
UnB_1295	TGGCC-TCGTCGATG-----ACCTACTTCACATCCGTATC-
<i>X.c.campestris</i>	CGGCA--TGTCGATGGTGTGCTTGCGCACCTGGAAGTTGCCATCGGCATCTTCCAGGTCG
<i>X.o.oryzae</i>	TGGCA--TGTCGATGGTGTGCTTGCGCACCTGGAAGTTGCCGTCGGCATCTTCCAGATCG
	* *
<i>X.a.citri</i>	CCCGGCCGTGCG-----CATGACCGTGGTGGCCGCCGACGGGCAATAC
UnB_1318	CCCGGCCGTGCG-----CATGACCGTGGTGGCCGCCGACGGGCAATAC
NCPBP_2475	CCCGGCCGTGCG-----CATGACCGTGGTGGCCGCCGACGGGCAATAC
UnB_1292	CCCGGCCGTGCG-----CATGACCGTGGTGGCCGCCGACGGGCAATAC
UnB_1295	CCCGGCCGTGAC-----CATGACCGTGGTGGCCGCCGACGGGCAATAC
<i>X.c.campestris</i>	CTCCACATGCCGTGCAGGTGGATGGGGTGTGTCATCATGGTG-TCGTTGACCAAGCAGAT
<i>X.o.oryzae</i>	CTCCACATGCCATGCAGATGGATGGGGTGTGTCATCATGGTG-TCGTTGACCAATACGAT
	* *
<i>X.a.citri</i>	GTGCATCCGGTCAGCGTG-----
UnB_1318	GTGCATCCGGTCAGCGTG-----
NCPBP_2475	GTGCATCCGGTCAGCGTG-----
UnB_1292	GTGCATCCGGTCAGCGTG-----
UnB_1295	ATGCATCCGGTCAGCGTG-----
<i>X.c.campestris</i>	ACGCAGCCGCTCGCCGTAAGGCTCGGCGAGGCGAAGGCGATGCCGTC
<i>X.o.oryzae</i>	GCGCAGCCGCTCGCCGTAAGGCTCGGCGAGGCGAAGGCGATGCCGTC
	. *
<i>X.a.citri</i>	-----GACGAAGTGC-CATC-----GCCGCGGCCG--
UnB_1318	-----GACGAAGTGC-CATC-----GCCGCGGCCG--
NCPBP_2475	-----GACGAAGTGC-CATC-----GCCGCGGCCG--
UnB_1292	-----GACGAAGTGC-CATC-----GCCGCGGCCG--
UnB_1295	-----GACTAAGTGC-CATC-----GCCGAGGCCG--
<i>X.c.campestris</i>	GAAGGACCGGCAACTTTTCCATGTGGCCGGTTAAGTGCAACTCGATTTCCGGCCCGG
<i>X.o.oryzae</i>	GAATGACCGGCAACTTTTCCATGTGGCCGGTTAAGTGCAACTCGATTTCCGGCCCGG

```

                *. * ** *      ***                                **.*.**

X.a.citri      -AAACCTTCGACGTGATTGTGCGAACCCTCGGCCAGGATGCGTTTACGTTATTCGCGCAG
UnB_1318      -AAACCTTCGACGTGATTGTGCGAACCCTCGGCCAGGATGCGTTTACGTTATTCGCGCAG
NCPBP_2475    -AAACCTTCGACGTGATTGTGCGAACCCTCGGCCAGGATGCGTTTACGTTATTCGCGCAG
UnB_1292      -AAACCTTCGACGTGATTGTGCGAACCCTCGGCCAGGATGCGTTTACGTTATTCGCGCAG
UnB_1295      -ACACCTTCAACGTGATTGCCGAACCCTCGTCCACGATGCCTTTACCTTATTCGCCGCAC
X.c.campestris TGCACGGCCGTCCGGGTCTGTCGAACAGGCTGTGCAGATCGCCGTAACAGAGCACCGCGCG
X.o.oryzae    CTCGCGGCCATCCGGGTCTGTCGAACACGCTGTGCAGATCGGCCGTAGCACAGCACGCGACG
                ..*   *.:*  *. * * *****.   * ** .: *  *.:*  .: * ** .

X.a.citri      GACAT-----GGGCCGC-ACCGGCTTCG-CCTGCGGCA-CGC--TGGCAGTGCAGCA
UnB_1318      GACAT-----GGGCCGC-ACCGGCTTCG-CCTGCGGCA-CGC--TGGCAGTGCAGCA
NCPBP_2475    GACAT-----GGGCCGC-ACCGGCTTCG-CCTGCGGCA-CGC--TGGCAGTGCAGCA
UnB_1292      GACAT-----GGGCCGC-ACCGGCTTCG-CCTGCGGCA-CGC--TGGCAGTGCAGCA
UnB_1295      GAGAT-----GGGTGGC-TCCTGCTTCG-CCTGCTGCT-CGC--TGGCGATGCAGCA
X.c.campestris GCCGTTGTTGCGCAGGCCAACGCCGGGTCTGTCAGCCGCGGTGCACTGGCATTTGCTGCG
X.o.oryzae    TCCGTTGTCGCGCAAGCCACGCCAGGGTCTGTCAGCCGCGCGCGGTGGCATTGCTGCG
                . . *      . . *      .   ** *   *** ** : *   **   **   *****.  *** : ** .

X.a.citri      CGG-----
UnB_1318      CGG-----
NCPBP_2475    CGG-----
UnB_1292      CGG-----
UnB_1295      CGG-----
X.c.campestris CATGTCGATCAGCGGGTTGTGGTCTTCGCTGGCGGGGTGGTGTGGCGCGCGGAGGATGC
X.o.oryzae    CATGTCGATCAACGGGTGCGCTCTTCGCTGGCGGGTTGATGCGGTGTCTTGGTCTGCGT
                * .

X.a.citri      -----
UnB_1318      -----
NCPBP_2475    -----
UnB_1292      -----
UnB_1295      -----
X.c.campestris ACTGGCGTGGCCGTGCTGTTGCAGGGC---GTGCGCAGATGGATCGTGC-TGCACGGTG
X.o.oryzae    GTTGCCACCCCATGCCCGTGCATTTCCGGCATCGGCATTGCCATCGCGTGTGCTGCATG

X.a.citri      -----
UnB_1318      -----
NCPBP_2475    -----
UnB_1292      -----
UnB_1295      -----
X.c.campestris TGGCCCGCATGCGTATCCGCCGCGAGGCGCCGTGCTGTGCCGGCATGTCATGCATTG-C
X.o.oryzae    CGCGTTCGCTTGCCTGCTACCGTTCGCTGCTACCGTTCGCGGTGCTGCGTGGTGC

X.a.citri      -----CTTGACG-----GCGCCG-AT
UnB_1318      -----CTTGACG-----GCGCCG-AT
NCPBP_2475    -----CTTGACG-----GCGCCG-AT
UnB_1292      -----CTTGACG-----GCGCCG-AT
UnB_1295      -----CTTGACG-----GCGCCG-AT
X.c.campestris GCCATGCGCCATGCCATCGCCGTGCCCCATATCCTGCATGGTGGAGGATGGCGCGCG--GA
X.o.oryzae    GCCATGCCCCATTCCATCGCCATGGCCGATGTCCTTGCATGGTGCAGAAATGGCGCGCG--GA
                * ****                                ****      .:

X.a.citri      TCCTGCGCTGG-ATCCGCG-----CGCCATCCTGAC-CATGCAGGA
UnB_1318      TCCTGCGCTGG-ATCCGCG-----CGCCATCCTGAC-CATGCAGGA
NCPBP_2475    TCCTGCGCTGG-ATCCGCG-----CGCCATCCTGAC-CATGCAGGA
UnB_1292      TCCTGCGCTGG-ATCCGCG-----CGCCATCCTGAC-CATGCAGGA
UnB_1295      TCCTGCGCTGC-ATCCGCG-----CGCCATCCTGAC-CATGCTGGA
X.c.campestris TCCTGTGCCGGAATCGGCGCCTGCAAGCCGTGGCGCACCGCCAGCGTGCCGAGGCAAA
X.o.oryzae    TCCAGTGCCGGAATCGGCGCCTGCAATCCGTGCTGCACCGCCAGTGTGCCGAGGCAAA

```

```

***:* ** * *** ***                                     ***** **.* ** *:.
X.a.citri          C-----ATGGGGCATGGCGATGG-----
UnB_1318          C-----ATGGGGCATGGCGATGG-----
NCPBPB_2475       C-----ATGGGGCATGGCGATGG-----
UnB_1292          C-----ATGGGGCATGGCGATGG-----
UnB_1295          C-----ATGGAGCATGTCCATGG-----
X.c.campestris    CCGGTGCGGCCCATGT-CTTGTGCGAACAGCGTAAAGGCATCCTGGCCGATGGGTTTCGAC
X.o.oryzae        CCGGTGCGGCCCATGT-CCTGAGCGAATAACGTAACGCATCCTGGCCGAGCGTTTCGAC
*                                     * * . * . * * * . :

X.a.citri          ----CATGGAT-----CACGCG-CTGCCCGCAATGC
UnB_1318          ----CATGGAT-----CACGCG-CTGCCCGCAATGC
NCPBPB_2475       ----CATGGAT-----CACGCG-CTGCCCGCAATGC
UnB_1292          ----CATGGAT-----CACGCG-CTGCCCGCAATGC
UnB_1295          ----CATGAAT-----CACGAG-CTGCCCGCAATGC
X.c.campestris    GAGGACATCGAATGTTTTCGGCGCGGCAATGCGCAATTCATCCACG-CTGACCCG-ATGC
X.o.oryzae        AATCACGTCGAAGGTTTTCGGCCGCGGCGATGCGCAGTTGGTCCACG-CTGACCCG-ATGC
* . * . * :                                           . * . * * * . * * * * *

X.a.citri          ACG-----GCGCGCCCG--GGATGCTGG-----
UnB_1318          ACG-----GCGCGCCCG--GGATGCTGG-----
NCPBPB_2475       ACG-----GCGCGCCCG--GGATGCTGG-----
UnB_1292          ACG-----GCGCGCCCG--GGATGCTGG-----
UnB_1295          ACA-----GCGCGCCCA--GGATGCTGG-----
X.c.campestris    ACATATTGGCCGTCGGCGCGGACCACGGTCATGCGCAGCCCGGGGATGCGGAGATCGAAA
X.o.oryzae        ACGTACTGCCATCGGCGGCCACCACGGTCATGCGCAGACCCGGGATGCGGATGTGGAAG
* . * . * . * * * * * . * * * * * . *

X.a.citri          -----
UnB_1318          -----
NCPBPB_2475       -----
UnB_1292          -----
UnB_1295          -----
X.c.campestris    TACGTCATCGAAGAACCATTGATGAAACGCAGTAGCACCTTTTCGCCAGGCTTGAATAGT
X.o.oryzae        TAAGTCATCGACGAGCCGTTGATGAAACGCAGCAACACCTTTTCGCCCGGCTTGAACAAT

X.a.citri          -CGGCGC-----ATGGGATGCACACCATG-----
UnB_1318          -CGGCGC-----ATGGGATGCACACCATG-----
NCPBPB_2475       -CGGCGC-----ATGGGATGCACACCATG-----
UnB_1292          -CGGCGC-----ATGGGATGCACACCATG-----
UnB_1295          -CGGCGC-----ATGGGATGCACACCATG-----
X.c.campestris    CCGGTCCAGTTGCCGGCCGGCGCCACGCGTTGAGCAGGTAGGTATAGGTGTTGGCGTTG
X.o.oryzae        CCGGTCCAGTTGCCGGCCGGCGCCACGCGATTGAGCAGGTAGGTGTTAGGTGTTGGCGTTG
* * * * * * . * . * * * * * * *

X.a.citri          -----CACTCGCATGACG----ATGCCAAG
UnB_1318          -----CACTCGCATGACG----ATGCCAAG
NCPBPB_2475       -----CACTCGCATGACG----ATGCCAAG
UnB_1292          -----CACTCGCATGACG----ATGCCAAG
UnB_1295          -----CTCTCGCATGACG----ATGCCGAG
X.c.campestris    ACGTCGGACAGGTCGGTCCGGGTCATGCGCATGCGCCCCACATGCCGCGGTCCGCCAAC
X.o.oryzae        ACGTCGGAGAGGTCGGTGGGCGTCATGCGCATCCGCCCCACATGCCGCGGTCTGCCAGC
* * * . * * * * * * * . * * * .

X.a.citri          -----GCACACG-----
UnB_1318          -----GCACACG-----
NCPBPB_2475       -----GCACACG-----
UnB_1292          -----GCACACG-----
UnB_1295          -----GCACACA-----
X.c.campestris    GTGGCGCGCAGCCGCTCTCGCGCGCATACGTACGAAGTCGCCACGGTGCCTGGGCG
X.o.oryzae        GTGGCGCGCAGCCGCTCTCGCGCGCATCGCGTAGAAAATGCCCCACGGTGCCTGGCGCA

```

,*.

X.a.citri -----ACAAGGCGCCGCATCA--TTCCGCCAGCGAAACCGGCAACCCG-----
 UnB_1318 -----ACAAGGCGCCGCATCA--TTCCGCCAGCGAAACCGGCAACCCG-----
 NCPPB_2475 -----ACAAGGCGCCGCATCA--TTCCGCCAGCGAAACCGGCAACCCG-----
 UnB_1292 -----ACAAGGCGCCGCATCA--TTCCGCCAGCGAAACCGGCAACCCG-----
 UnB_1295 -----ACATGGCGCCGCATCA--TTCCGCCAGCGAAACGGGTACCCG-----
X.c.campestris TAGTTGTCGTGGCTGGGCATCTGCTTGAGCCGGCGGAACAGCGCAGCCGGTCCAGATCG
X.o.oryzae TCGTTGTCGTGGCTGGGCATCTGTTTCAAACGGCGGAACAGTGCGGCCGGTCCGAGATCT
 :*.:*** *****: ** ..*.***.*.*.* . ***

X.a.citri -----CTGATCGACATGCGC-----
 UnB_1318 -----CTGATCGACATGCGC-----
 NCPPB_2475 -----CTGATCGACATGCGC-----
 UnB_1292 -----CTGATCGACATGCGC-----
 UnB_1295 -----CTGATCGACATGCGC-----
X.c.campestris GTCCAGTCCGACAGCAGCACCACGTGCTCGCGGTCAAACCGGTAGGGCGGCGGTGCCAGC
X.o.oryzae GTCCAGTCCGAGAGCAGCACCACATGCTCGCGATCATGCCGATACGGCGGCGGCGTCCAGC
 :.:* **.*** *

X.a.citri -----AGCAATGC---CACT-----
 UnB_1318 -----AGCAATGC---CACC-----
 NCPPB_2475 -----AGCAATGC---CACC-----
 UnB_1292 -----AGCAATGC---CACC-----
 UnB_1295 -----AACTCTGC---CACC-----
X.c.campestris GGGTTCGATCACGATCGCCCCGTATAGCCCCGCTGCTCCTGGAACATCGAATGGCTGTGA
X.o.oryzae GGGTTCGATGACGATGGCGCCATACAGCCCGCCTGCTCCTGGAACATCGAATGGCTGTGG
 *. * . ** *:*

X.a.citri -----GCACCG-----CGCCTGGACG-----
 UnB_1318 -----GCACCG-----CGCCTGGACG-----
 NCPPB_2475 -----GCACCG-----CGCCTGGACG-----
 UnB_1292 -----GCACCG-----CGCCTGGACG-----
 UnB_1295 -----GCACCG-----CTCCTGGACT-----
X.c.campestris TACCAGTAGGTGCCGGATTGGCGCAGCGGAAGCGGTACAGGTACTCCTGGCCCGGTGCG
X.o.oryzae TACCAGTAGGTGCCGGACTGGCGCAGCGCAAAGCGGTAGTGATACTCCTGGCCCGGCGCG
 * .*** * *****.*

X.a.citri -----ACCCCGGCGTGGGCCTGCG-----
 UnB_1318 -----ACCCCGGCGTGGGCCTGCG-----
 NCPPB_2475 -----ACCCCGGCGTGGGCCTGCG-----
 UnB_1292 -----ACCCCGGCGTGGGCCTGCG-----
 UnB_1295 -----ACCACGTCGTGATCCTGCT-----
X.c.campestris ATGCCGTCGAAAGCTCATGCCGGGCACGCGTCCATGTTGGCCGGCAGCAGCAAAGCGGTGCG
X.o.oryzae ATGCCGTCGAAACTCATGCCGGGCACGCCATCCATGTTGGCCGGCAGCAGCAGGCCATGCG
 . * * ** . ** **

X.a.citri -----CGACAACG
 UnB_1318 -----CGACAACG
 NCPPB_2475 -----CGACAACG
 UnB_1292 -----CGACAACG
 UnB_1295 -----CGACAACA
X.c.campestris CAATGCACGGAGGTGAACTGGTCCGGCCAGGGCGTTACGCACCCGCACGCTGACGGTGTGCG
X.o.oryzae CAATGCACCGAGGTGGGCTGGTCCGGTCCAGCGCGTTGCCGCACGCGCACGCTCACTGTGTCG
 * . .:*.:

X.a.citri GCCGC-CGCGTGCTGTGCTACG-----
 UnB_1318 GCCGC-CGCGTGCTGTGCTACG-----
 NCPPB_2475 GCCGC-CGCGTGCTGTGCTACG-----
 UnB_1292 GCCGC-CGCGTGCTGTGCTACG-----
 UnB_1295 ACAAC-CGCGTGCTGTGCTACG-----
X.c.campestris CCCTCGCGCCAGCGCAGCGTGGGTGCCGGCAGCGACTGGTTGACGGTGATGGCGCTGCGC
X.o.oryzae CCCTCGCGCCAGCGCAGGATCGGTGCCGGCAGGCGCTGGTTGACGGTGATCGCGGGACGG

```

* . * * * : * * : * : *

X.a.citri      -----CCGATCTGCATAGCGTGTTCGACGACCCGG
UnB_1318      -----CCGATCTGCATAGCGTGTTCGACGACCCGG
NCPBPB_2475   -----CCGATCTGCATAGCGTGTTCGACGACCCGG
UnB_1292      -----CCGATCTGCATAGCGTGTTCGACGACCCGG
UnB_1295      -----CCGATCT-----
X.c.campestris GCGCGGCCGGTGAGGTTGACCGGCATGCGGCCGATCTGCAGCGCCGCGGCCGCCACGC
X.o.oryzae    GTGCGGCCGGTGAAATCGACCGGCATGCGGCCGATCTGCAGCGACTGGCTGCTGCCGCGC
                    *****

X.a.citri      A-----TGGGCGCGAACCAGGCCGTGACATCGAGCTGCATCTGACCGGGC
UnB_1318      A-----TGGGCGCGAACCAGGCCGTGACATCGAGCTGCATCTGACCGGGC
NCPBPB_2475   A-----TGGGCGCGAACCAGGCCGTGACATCGAGCTGCATCTGACCGGGC
UnB_1292      -----
UnB_1295      -----
X.c.campestris AGGACGGCGGGCGTGGCGTACGCGGGGTGGCGCGTGCCTCGCTGCGCCACAGGCCGGTG
X.o.oryzae    AGTACCGGGG---TGTGGCCGGAGTGGCTGCGCGCGCATCGCGGCCACAGGCCGCCG

X.a.citri      ATATGGAAAAATTTCGCATGGTCTTCGATGGCATCGCGTTCGCTT-----
UnB_1318      ATATGGAAAAATTTCGCATGGTCTTCGATGGCATCGCGTTCGCTTCCGCGCAACCCTTGC
NCPBPB_2475   ATATGGAAAAATTTCGCATGGTCTTCGATGGCATCGCGTTCGCTT-----
UnB_1292      -----
UnB_1295      -----
X.c.campestris GCCGCGGCAACGCGCCAGCGCCAGGCCGTGCACGAAGCGGCGCGGCCAGCCGCCG
X.o.oryzae    GCAACGGCAATGCCGCCAGGGCCAAGCCTTGCACGAAGCGGCGCGGCTCAGGCCGTTG

X.a.citri      -----
UnB_1318      GGCTGCAATACGACGAGCGCCTGCGCATCGTGCTGGTCAACGACACCAT-----
NCPBPB_2475   -----
UnB_1292      -----
UnB_1295      -----
X.c.campestris TTG-----GACAAGGGATCGAATGACAT-----
X.o.oryzae    CTGGATGAAGCATCGGAACACGGGGAATCGAAAGACATGACATCTCCGGTGCCTTCCATC

X.a.citri      -----
UnB_1318      -----
NCPBPB_2475   -----
UnB_1292      -----
UnB_1295      -----
X.c.campestris -----
X.o.oryzae    GTCAAGACGGACGCATCGCATAGCTGAGAAAACCCACGCAACGCGCGCGGGGCCGATG

X.a.citri      -----
UnB_1318      -----
NCPBPB_2475   -----
UnB_1292      -----
UnB_1295      -----
X.c.campestris -----
X.o.oryzae    ACGGCCAA

```

DADOS REFERENTES AOS TESTES DE TOLERÂNCIA *IN VITRO* AO COBRE
EM *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*

Tabela 14. Número médio de colônias de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* observado *in vitro* em meio MMCC contendo sulfato de cobre em diferentes concentrações.

Isolados		Cu ⁺⁺ (µg/ml)						
		0	10	20	30	40	50	60
1	NCP PB 2475	3560 ^a	0	0	0	0	0	nt ^b
2	UnB 1183	1940	1640	640	480	0	0	nt
3	IBSBF 1369	620	400	320	140	0	0	nt
4	IBSBF 1385	1940	1880	1640	260	0	0	nt
5	UnB 1190	5100	3500	1480	20	0	0	nt
6	UnB 1204	2180	1880	140	0	0	0	nt
7	UnB 1205	6460	3600	0	0	0	0	nt
8	UnB 1216	600	160	140	0	0	0	nt
9	UnB 1212	1200	1100	700	40	0	0	nt
10	UnB 1222	3800	3300	660	0	0	0	nt
11	UnB 1292	1800	1740	1580	860	20	0	nt
12	UnB 1293	2520	1980	0	0	0	0	nt
13	UnB 1294	2580	2200	2100	1560	0	0	nt
14	UnB 1295	1100	1020	640	0	0	0	nt
15	UnB 1298	1840	1600	1500	1380	1140	0	nt
16	UnB 1299	3340	3320	3040	2960	2960	540	0
17	UnB 1301	2600	2460	2360	1860	1500	0	nt
18	UnB 1310	3260	2640	220	20	0	0	nt
19	UnB 1314	1960	1820	1600	80	20	0	nt
20	UnB 1316	3120	2600	2360	40	0	0	nt
21	UnB 1318	2560	2140	2120	1860	80	0	nt

^a média de três repetições (dados expressos em ufc/ml)

^b não testado nesta concentração

Tabela 15. Número médio de colônias de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* observado *in vitro* em meio MMCC contendo oxiclreto de cobre em diferentes concentrações.

Isolados		Cu ⁺⁺ (µg/ml)						
		0	10	20	30	40	50	60
1	NCPPB 2475	4020 ^a	0	0	0	0	0	nt ^b
2	UnB 1183	2640	2340	100	0	0	0	nt
3	IBSBF 1369	1100	840	700	280	160	40	0
4	IBSBF 1385	1060	860	340	0	0	0	nt
5	UnB 1190	3900	2540	1120	0	0	0	nt
6	UnB 1204	3900	2540	0	0	0	0	nt
7	UnB 1205	4660	4100	2440	0	0	0	nt
8	UnB 1216	820	380	280	160	0	0	nt
9	UnB 1212	1640	580	200	0	0	0	nt
10	UnB 1222	3580	3240	1640	0	0	0	nt
11	UnB 1292	2200	2100	1660	1040	620	0	nt
12	UnB 1293	2900	2340	1340	0	0	0	nt
13	UnB 1294	960	860	820	0	0	0	nt
14	UnB 1295	1920	1880	0	0	0	0	nt
15	UnB 1298	1260	900	620	0	0	0	nt
16	UnB 1299	1800	1600	1440	800	0	0	nt
17	UnB 1301	2200	1420	1180	740	0	0	nt
18	UnB 1310	2840	1320	120	100	40	0	nt
19	UnB 1314	2500	1420	1340	1200	1100	0	0
20	UnB 1316	2500	1800	1400	1220	1060	120	0
21	UnB 1318	1940	1640	640	480	0	460	nt

^a média de três repetições (dados expressos em ufc/ml)

^b não testado nesta concentração

(Matriz de Similaridade rep-PCR)

ERIC-PCR

Bandas	NCPPB 2475	UnB 1183	UnB 1204	UnB 1212	UnB 1222	UnB 1227	UnB 1292	UnB 1293	UnB 1294	UnB 1295	UnB 1296	UnB1297	UnB 1298
2036	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
1600	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
1500	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
800	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
700	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
600	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
550	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
500	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
490	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1
400	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
270	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
170	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Bandas	UnB 1299	UnB 1300	UnB 1301	UnB 1302	UnB 1303	UnB 1304	UnB 1305	UnB 1306	UnB 1307	UnB 1308	UnB 1309	UnB 1310	UnB 1311
2036	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1600	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
550	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
490	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1
400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
270	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
170	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Bandas	UnB 1312	UnB 1313	UnB 1314	UnB 1315	UnB 1316	UnB 1317	UnB 1318						
2036	1	1	1	1	1	1	1						
1600	1	1	1	1	1	1	1						
1500	1	1	1	1	1	1	1						
800	1	1	1	1	1	1	1						
700	1	1	1	1	1	1	1						
600	1	1	1	1	1	1	1						
550	0	0	0	0	0	0	0						
500	1	1	1	1	1	1	1						
490	1	1	1	0	1	1	0						
400	1	1	1	1	1	1	1						
270	1	1	1	1	1	1	1						
170	1	1	1	1	1	1	1						

BOX-PCR

Bandas	NCPPB 2475	UnB 1183	UnB 1204	UnB 1212	UnB 1222	UnB 1227	UnB 1292	UnB 1293	UnB 1294	UnB 1295	UnB 1296	UnB1297	UnB 1298
2036	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
1700	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
1400	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
1100	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
950	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
800	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
400	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
344	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
250	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
Bandas	UnB 1299	UnB 1300	UnB 1301	UnB 1302	UnB 1303	UnB 1304	UnB 1305	UnB 1306	UnB 1307	UnB 1308	UnB 1309	UnB 1310	UnB 1311
2036	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
950	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
344	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
250	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Bandas	UnB 1312	UnB 1313	UnB 1314	UnB 1315	UnB 1316	UnB 1317	UnB 1318						
2036	1	1	1	1	1	1	1						
1700	0	1	1	1	1	1	1						
1400	0	0	1	0	0	0	0						
1100	1	1	1	1	1	1	1						
950	0	1	1	1	1	1	1						
800	1	1	1	1	1	1	1						
700	1	1	1	1	1	1	1						
400	1	1	1	1	1	1	1						
344	1	1	1	1	1	1	1						
250	1	1	1	1	1	1	1						

REP-PCR

Bandas	NCPB 2475	UnB 1183	UnB 1204	UnB 1212	UnB 1222	UnB 1227	UnB 1292	UnB 1293	UnB 1294	UnB 1295	UnB 1296	UnB1297	UnB 1298
2800	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2036	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1
1700	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1300	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
1200	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1100	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
900	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1
800	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
600	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
450	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
410	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
400	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
396	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
350	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
250	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
190	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1
Bandas	UnB 1299	UnB 1300	UnB 1301	UnB 1302	UnB 1303	UnB 1304	UnB 1305	UnB 1306	UnB 1307	UnB 1308	UnB 1309	UnB 1310	UnB 1311
2800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2036	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
450	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
410	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
396	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
350	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0
250	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
190	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1

Bandas	UnB 1312	UnB 1313	UnB 1314	UnB 1315	UnB 1316	UnB 1317	UnB 1318
2800	0	0	0	0	0	0	0
2036	1	1	1	1	1	1	1
1700	0	0	0	0	0	0	0
1500	1	1	1	1	1	1	1
1300	1	1	1	1	1	1	1
1200	1	1	1	1	1	1	1
1100	1	1	1	1	1	1	1
900	1	1	1	1	1	1	1
800	1	1	1	1	1	1	1
600	1	1	1	1	1	1	1
450	0	0	0	0	0	0	0
410	1	1	1	1	1	1	1
400	0	0	0	0	0	0	0
396	0	0	0	0	0	0	0
350	1	1	1	1	1	0	1
250	1	1	1	1	1	1	1
190	1	1	1	1	1	1	1