



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Fitopatologia

**Detecção molecular de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videiras
assintomáticas**

Anna Cristina de Freitas

Brasília - DF

2012

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fitopatologia
Programa de Pós-graduação em Fitopatologia

**Detecção molecular de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videiras
assintomáticas**

Anna Cristina de Freitas
Orientadora: Profa. Dra. Marisa A. S. Velloso Ferreira

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Fitopatologia, do
Departamento de Fitopatologia da
Universidade de Brasília, como requisito
para obtenção do grau de Mestre em
Fitopatologia.**

Brasília - DF
Março 2012

Trabalho de Dissertação de Mestrado realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob a orientação da Professora Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira, com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Aprovado por:

Profa. Dra. Marisa A. S. Velloso Ferreira
Orientadora
Universidade de Brasília

Dra. Abi Soares dos Anjos Marques
Embrapa Quarentena Vegetal

Dra. Alice Maria Quezado Duval
Embrapa Hortaliças

**"Todos os acontecimentos são
ótimas oportunidades para a
evolução."**

Seicho Taniguchi

*Aos meus queridos pais, Gertrudes
e Newton, por todo amor, carinho,
respeito, incentivo e confiança durante
todos os momentos de minha vida.*

Ofereço

*Ao meu esposo Welitom,
pelo amor, compreensão e apoio
demonstrados em todos os
momentos de realização deste
mestrado.*

Dedico

Agradecimentos

À Deus, que me guia e me conforta em todos os momentos da vida.

À minha família que mesmo à distância sempre me apoiou.

À professora Marisa A. S. V. Ferreira pelos ensinamentos repassados, pelas críticas construtivas, pela orientação e amizade.

À Dra. Maria Angélica Guimarães Barbosa e a todos os funcionários da Embrapa Semiárido que contribuíram para a realização deste trabalho.

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

Aos membros da Banca Examinadora pela disponibilidade de avaliar esta dissertação.

Aos Funcionários do Departamento de Fitopatologia, da Universidade de Brasília, Arlindo, Arenildo, Maria Evangelista, Kamila, César e Ribamar Frazão que me ajudaram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho.

Às colegas Tatiana, Claudênia, Valéria e Edna pelo auxílio e amizade.

Aos colegas de Mestrado e Doutorado William Soares, Joelma Silva, Marcilene Fernandes, Daniel Lage, Kamila Araújo, Justino Dias, Eder Marques, Guilherme Lapidus, Bernardo Viscardi e Fernanda Naito pelos momentos de alegrias e dificuldades que passamos juntos.

Aos Amigos Edriana e Lucas que várias vezes dividiram comigo minhas lágrimas, me confortaram com palavras de esperança e contagiaram meu coração com sua alegria.

A todos aqueles que possam ter colaborado direta ou indiretamente para a realização e término deste trabalho.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL, JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	1
1- A CULTURA DA VIDEIRA	2
2- O CANCRO BACTERIANO DA VIDEIRA	5
2.1- Histórico e Distribuição Geográfica	5
2.2- Sintomas.....	7
2.3- Etiologia e Diagnose	8
2.4- Epidemiologia	11
2.5- Controle	144
3- JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	177
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	222
CAPÍTULO 2 - DETECÇÃO MOLECULAR DE <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> EM VIDEIRAS ASSINTOMÁTICAS	311
RESUMO	322
ABSTRACT	333
1. INTRODUÇÃO	344
2. MATERIAL E MÉTODOS	399
2.1. Meios de cultura, cultivo e preservação dos isolados	399
2.2. Extração de DNA	399
2.3. PCR específica: BIO-PCR e Nested-PCR	40
2.4. Determinação do limite mínimo de detecção de <i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i> por BIO-PCR e Nested-PCR em cachos inoculados artificialmente	41
2.5. Determinação do limite mínimo de detecção de <i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i> por BIO-PCR e Nested-PCR em folhas inoculadas artificialmente	433
2.6. Detecção de <i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i> em mudas de videira por BIO-PCR e Nested-PCR inoculadas artificialmente	433

2.7. Desenvolvimento de controle interno para falsos negativos	444
2.8. Validação da BIO-PCR e Nested-PCR para detecção de Xcv em viveiros e áreas de produção.....	455
RESULTADOS.....	466
Determinação do limite mínimo de detecção de <i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i> por BIO-PCR e Nested-PCR em cachos inoculados artificialmente.....	466
Determinação do limite mínimo de detecção de <i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i> por BIO-PCR e Nested-PCR em folhas inoculadas artificialmente	488
Detecção de <i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i> por BIO-PCR e Nested-PCR em mudas de videira inoculadas artificialmente	499
Validação da BIO-PCR e Nested-PCR para detecção de Xcv em viveiros e áreas de produção de videira.....	499
PCR com controle interno para falsos negativos.....	50
DISCUSSÃO.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	644
ANEXOS.....	70

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Produção de uvas (em toneladas) no Brasil em toneladas nos anos de 2007 a 2010, distribuída pelos principais estados produtores.....20

Tabela 2. Área cultivada (em hectares) de videira no Brasil nos anos de 2007 a 2010, distribuída pelos principais estados produtores.....20

Capítulo 2

Tabela 1. Detecção molecular por BIO-PCR de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em frutos assintomáticos de videira inoculados artificialmente.....57

Tabela 2. Detecção molecular por Nested-PCR de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em frutos assintomáticos de videira inoculados artificialmente.....57

Tabela 3. Detecção molecular por BIO-PCR de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em folhas assintomáticas de videira inoculadas artificialmente.....58

Tabela 4. Detecção molecular por Nested-PCR de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em folhas assintomáticas de videira inoculadas artificialmente.....58

Tabela 5. Detecção molecular por PCR de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em mudas de videira cv. Thompson Seedless inoculadas artificialmente.....59

Tabela 6. Detecção molecular por PCR de *Xantomonas campestris* pv. *viticola* em folhas de mudas de videiras assintomáticas, coletadas em viveiros na região do Vale do Submédio São Francisco, em janeiro de 2012.....59

Tabela 7. Detecção molecular por PCR de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em folhas de videiras assintomáticas e sintomáticas, coletadas em áreas de produção na região do Vale do Submédio São Francisco, em janeiro de 2012.....59

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Sintomas do cancro bacteriano da videira, causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*: **A.** Pontos necróticos na folha; **B.** Morte de áreas do limbo foliar; **C.** Necrose nas nervuras e pecíolo da folha; **D.** Cancro no ramo; **E.** Cancro na ráquis; **F.** Necrose em baga. **A, E e F.** fotos de L.C.Trindade; **B.** extraído de Halfeld-Vieira et al., 2008; **C.** extraído de Lima et al., 2002; e **D.** foto de A.C. Freitas.....18

Figura 2. Ciclo do cancro bacteriano causado pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videira (extraído de Mariano et al., 2001)..... 19

Capítulo 2

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da BIO-PCR realizada a partir de cachos de videira inoculados com *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* isolado A-2 em diferentes concentrações, de 10^2 a 10^8 ufc/ml, utilizando o par de iniciadores Xcv1F/X v3R. **M** – Marcador 100pb DNA Ladder (Ludwig - Biotec); **CN** – Controle Negativo: reação livre de DNA; **CP** – Controle Positivo: DNA purificado do isolado A-2; **1** – Suspensão a 10^8 ufc/ml, utilizada para pulverização nos frutos; **2** – Amostras inoculadas com água (controle); **3** -10^2 ufc/ml; **4** -10^3 ufc/ml; **5** -10^4 ufc/ml; **6** -10^5 ufc/ml; **7** -10^6 ufc/ml; **8** -10^7 ufc/ml; **9** -10^8 ufc/ml.....60

Figura 2. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de BIO-PCR utilizando os iniciadores Xcv1F/Xcv3R. **M** – Marcador 100pb DNA Ladder (Promega); **CN** –

controle negativo: reação livre de DNA; C; **CP** – controle positivo de DNA purificado do isolado A-2; **1–3**: Lavado de placas de folhas sem sintomas de mudas de viveiro....60

Figura 3. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de BIO-PCR e Nested-PCR utilizando os iniciadores Xcv1F/Xcv3R. **M** – Marcador 100pb DNA Ladder (Promega); **CN** – controle negativo: reação livre de DNA; C; **CP** – controle positivo de DNA purificado do isolado A-2; **1–7**: Lavado de folhas com sintomas de áreas de produção; **8-14**: Lavado de folhas sem sintomas de áreas de produção.....61

Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da PCR com os iniciadores Xcv1F/Xcv3R (240pb) e F984/R1492 (545pb). **M** – Marcador 100pb DNA Ladder (Promega); **CN** – controle negativo: reação livre de DNA; **1** – DNA purificado do isolado A-2; **2** - DNA purificado do isolado UnB 1183.....61

Figura 5. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da BIO-PCR com iniciadores Xcv1F/Xcv3R realizada a partir de folhas de videira inoculadas com *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (isolado A-2) em diferentes concentrações, de 10^2 a 10^8 ufc/ml e F984/R1492 (545pb). **M** – Marcador 100pb DNA Ladder (Promega); **CN** – controle negativo: reação livre de DNA; **CP** – controle positivo: DNA purificado do isolado A-2; **1** – Suspensão a 10^8 ufc/ml, utilizada para pulverização nos frutos; **2** – Amostras inoculadas com água (controle); **3** – 10^2 ufc/ml; **4** – 10^3 ufc/ml; **5** – 10^4 ufc/ml; **6** – 10^5 ufc/ml; **7** – 10^6 ufc/ml; **8** – 10^7 ufc/ml; **9** – 10^8 ufc/ml.....62

Figura 6. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de BIO-PCR e Nested-PCR, utilizando os iniciadores Xcv1F/Xcv3R (240pb) e F984/R1492 (545pb). **M** – Marcador 100pb DNA Ladder Promega); **CN** – controle negativo: reação livre de DNA;

C; **CP** – controle positivo de DNA purificado do isolado A-2; **1** – Lavado de folhas Red Globe com sintomas; **2-17**: Amostras sem sintomas de Xcv, negativas por BIO-PCR ou Nested-PCR com iniciadores Xcv1F/Xcv3R.....62

Figura 7. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de BIO-PCR e Nested-PCR, utilizando os iniciadores F984/R1492 (545pb). **M** – Marcador 100pb DNA Ladder (Promega); **CN** – controle negativo: reação livre de DNA; **CP** – controle positivo de DNA purificado do isolado A-2; **1** – Lavado de folhas de Red Globe com sintomas; **2-17**: Amostras sem sintomas de Xcv, negativos pro BIO-PCR ou Nested-PCR com iniciadores Xcv1F/Xcv3R.....63

RESUMO

O cancro bacteriano da videira, causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Xcv) Nayudu (Dye), foi detectado no Brasil pela primeira vez em 1998, em plantas de *Vitis vinifera*, variedade Red Globe, em Petrolina, Pernambuco. A doença é responsável por prejuízos ao cultivo da videira no Vale do Submédio São Francisco, apresentando incidência expressiva e importância econômica. Uma das medidas mais eficazes para conter sua disseminação para novas áreas é o uso de material de propagação livre do patógeno. Este estudo teve como objetivo geral otimizar a técnica de PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) para detecção de Xcv em tecidos assintomáticos de videira. Foram objetivos específicos: determinar o limite mínimo de detecção por BIO-PCR aliado ao uso de meio semi-seletivo NYDAM e por Nested-PCR em frutos e folhas inoculados e assintomáticos; desenvolver um controle interno para falsos negativos e validar a BIO-PCR e a Nested-PCR em mudas de viveiros e em plantas sintomáticas e assintomáticas de áreas de produção no Vale do Submédio São Francisco. A determinação do limite mínimo de detecção de Xcv por BIO-PCR e Nested-PCR foi realizada com a inoculação de Xcv em frutos e folhas de videira nas concentrações de 10^2 a 10^8 ufc/ml. O limite mínimo de detecção por BIO-PCR em frutos e folhas foi de 10^2 ufc/ml. Com a Nested-PCR o limite mínimo de detecção em frutos foi de 10^2 ufc/ml e de 10^3 ufc/ml em folhas. Para o desenvolvimento do controle interno, foram incluídos iniciadores universais para o gene do 16S rRNA de bactérias (F984/1492) em reações multiplex com os iniciadores Xcv1F/Xcv3R. Amplificação dos dois fragmentos esperados ocorreu com DNA purificado de Xcv e com amostras positivas (lavados de folhas) por BIO-PCR e Nested-PCR. Contudo, em 16 amostras negativas por Nested-PCR, apenas em uma ocorreu a amplificação do fragmento correspondente ao gene de 16SrRNA. Na validação dos métodos em áreas de produção com histórico da doença,

97% das amostras coletadas com sintomas foram positivas por BIO-PCR e 69,7% positivas por Nested-PCR. Entre as amostras sem sintomas, a detecção de Xcv só foi possível por BIO-PCR (29,7 % das amostras). De 60 amostras de mudas assintomáticas coletadas em dois viveiros na região, detectou-se Xcv por BIO-PCR em três amostras (5%) de um dos viveiros.

ABSTRACT

Bacterial canker of grapevine, caused by *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Xcv) Nayudu (Dye), was detected in Brazil in 1998, affecting plants of *Vitis vinifera*, cultivar Red Globe, in Petrolina, Pernambuco State. This disease is responsible for economic losses in vineyards in the São Francisco river valley, northeastern Brazil. One of the most effective measures to prevent its dissemination to new areas is the use of pathogen-free propagating material. The objective of the present study was to optimize the PCR (polymerase chain reaction)-based method to detect Xcv in asymptomatic grapevine tissues. The specific objectives were: to determine the minimum detection limits of BIO-PCR combined with the use of the semi-selective medium NYDAM and of Nested-PCR in inoculated and asymptomatic fruits and leaves; to develop an internal control for false negatives; and to validate the BIO-PCR and Nested-PCR methods by testing asymptomatic plants from nurseries and symptomatic and asymptomatic plants from grapevine-producing areas in the São Francisco river valley. The detection limit of BIO-PCR and Nested-PCR was performed by inoculating Xcv in grapevine fruits and leaves, at concentrations from 10^2 to 10^8 cfu/ml. The lower detection limit of BIO-PCR in fruits and leaves was 10^2 cfu/ml. Using Nested-PCR, the detection limit in fruits was 10^2 cfu/ml, and 10^3 cfu/ml in leaf samples. To develop the internal control for PCR, universal primers for bacterial 16S rRNA gene (F984/1492) were included in multiplex reactions with primer pair Xcv1F/Xcv3R. Amplification of the two expected fragments occurred with purified Xcv DNA and with samples (washes from leaves) tested positive by BIO-PCR and Nested-PCR. However, only one out of 16 samples tested negative by nested-PCR yielded the 16SrRNA amplicon. When validating the methods in production areas with a history of the disease, 97% of the symptomatic samples were positive by BIO-PCR and 69.7% positive by Nested-PCR. Among asymptomatic

samples, detection of Xcv was possible only by BIO- PCR (29.7% of samples). Among 60 samples from asymptomatic plants collected in two nurseries in the region, Xcv was detected by BIO-PCR in three samples (5%) from one of the nurseries.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL, JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

1- A CULTURA DA VIDEIRA

A videira (*Vitis* spp. L.) pertencente à família Vitaceae, tem o atual cultivo praticado desde a antiguidade. Na antiga cidade comercial de Kannish na Turquia, fósseis encontrados apontaram que a viticultura era exercida desde a idade do bronze, há cerca de 3.500 anos a.C. Esta prática propagou-se por toda a Ásia Menor e em direção ao Sul, até a Síria e o Egito. A videira foi levada para a Itália e a França por navegadores fenícios e posteriormente distribuída por toda Europa. Os espanhóis introduziram a espécie *V. vinifera* L. no México e nos Estados Unidos (Leão & Possídio, 2000).

No Brasil, a videira foi introduzida em 1532, por Martim Afonso de Souza, na Capitania de São Vicente, permanecendo sem importância comercial. Impulsionados pelas correntes migratórias italianas, foi a partir da segunda metade do século XIX que a vitivinicultura brasileira passou a ter importância econômica no Sul e Sudeste do país (Leão & Possídio, 2000).

A videira destaca-se por ser uma das culturas frutíferas mais plantadas no mundo. Em 2007, a superfície mundial cultivada com videiras foi de 7.272.583 hectares, totalizando a produção no mesmo período com 67,22 milhões de toneladas. A Itália é o maior produtor mundial, seguida pela França, Estados Unidos, China e Espanha. O Brasil ocupou a 19ª posição no ranking mundial (Mello, 2009).

No Brasil, a videira é cultivada nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Bahia e Pernambuco (IBGE, 2011). A viticultura também vem sendo implantada em vários Estados, como Mato Grosso do Sul, Goiás, Espírito Santo, Ceará e Piauí. Em 2010, apenas 43,07% da produção foi destinada ao processamento para elaboração de vinhos, suco de uva e derivados, sendo o restante destinado ao mercado de uva *in natura* (Mello, 2010).

Considerando-se o período entre 2007 e 2010, houve queda na produção de uvas na maioria dos estados brasileiros, devido a fatores climáticos desfavoráveis, especialmente nas áreas de produção de uvas para vinhos, resultando em menor produção (Mello, 2010; Tabela 1). Pernambuco foi o único Estado que apresentou aumento da produção (6,13%) em 2010 comparado a 2009, mas ainda não recuperou o montante registrado em 2007.

Com relação à área cultivada de videira do ano de 2009 para 2010, o Brasil teve um aumento de 1,37% (Tabela 2). Enquanto o Estado de Pernambuco teve sua área plantada ampliada em 23,89%, na Bahia ocorreu redução de 12,11%. O Estado de Santa Catarina apresentou aumento de 2,33% na área plantada. Nos demais Estados, as áreas permaneceram inalteradas ou apresentaram pequena redução (Mello, 2010).

A videira pode ser cultivada para diferentes fins, sendo classificada comercialmente em: uvas para mesa (consumo *in natura*), para vinificação, para passas e para sucos doces (Leão, 2000).

As uvas de mesa produzidas no Brasil podem ser divididas em dois grupos: um formado pelas uvas finas de mesa (*V. vinifera*), representado principalmente por cultivares como a Itália e suas mutações (Rubi, Benitaka e Brasil), Red Globe, Red Meire, Patrícia e as sem sementes (Centennial Seedless, Superior Seedless ou Festival, Thompson Seedless, Perlette, Catalunha e Crimson Seedless); e outro pelas uvas comuns ou rústicas de mesa (*V. labrusca*), cuja representante principal é a cultivar Niágara Rosada (Nachtigal, 2003).

A produção de uvas finas de mesa está concentrada nas regiões Norte do Paraná, Noroeste de São Paulo, do Vale do Submédio São Francisco e de Pirapora, sendo que a cultivar Itália e suas mutações respondem por cerca de 90% da quantidade de uvas produzidas (Nachtigal, 2003).

A Região do Vale do Submédio São Francisco, situada no trópico semiárido brasileiro, é a região vitícola tropical do país, onde se sobressaem os municípios de Santa Maria da Boa Vista e Petrolina, no Estado de Pernambuco e Juazeiro, Casa Nova, Curaçá e Sento Sé, no Estado da Bahia (Silva & Correia, 2000).

O Vale do Submédio São Francisco vem se destacando no cenário nacional, não apenas por ser o principal centro produtor e exportador de uvas de mesa do Brasil, responsável por 95% das exportações nacionais de uvas finas de mesa, possuindo quase 9000 hectares de área cultivada (Oliveira et al., 2008/2009; Mello, 2010), mas, também por sua importância socioeconômica, por gerar um grande número de empregos diretos e indiretos. O cultivo da videira no Nordeste gera cerca de 5 empregos/hectare/ano, representando o maior índice entre as culturas perenes e anuais (Silva & Correia, 2000).

Apesar da expansão da viticultura no semiárido brasileiro, com o grande avanço da área plantada, as várias fases fenológicas da planta encontradas de forma simultânea nos pomares e a importação de novos materiais genéticos, têm favorecido a ocorrência de doenças causadas por fungos, vírus, nematoides e bactérias (Tavares et al., 2000).

Entre os fungos de importância para a cultura no Brasil, pode-se citar: *Botryodiplodia theobromae* Pat. (podridão seca ou morte descendente), *Plasmopara viticola* Berl & Toni (míldio), *Uncinula necator* (Shw.) Burril (oídio), *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (mofo cinzento), *Elsinoe ampelina* (de Bary) Shear (antracnose), *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *herbemontis* Tocchetto (fusariose), *Eutypa lata* (Pers. Fr.) Tul. & C. Tul. (eutipa ou declínio) e *Phakopsora euvitidis* Ono (ferrugem da videira) (Tavares et al., 2000; Lima & Moreira, 2002; Manica & Pommer, 2006).

Dentre os vírus destacam-se: *Grapevine leafroll virus* (vírus do enrolamento da folha da videira), *Grapevine fanleaf virus* (vírus da folha em leque ou dos entrenós curtos da videira), *Grapevine corky bark disease* (vírus do entumescimento dos ramos

da videira), *Grapevine stem pitting disease* (doença das caneluras do tronco da videira), *Fleck disease* (mancha ou mosaico das nervuras) e *Vein necrosis disease* (necrose das nervuras) (Lima & Moreira, 2002).

Entre os nematoides destacam-se: *Meloidogyne* spp. (nematóide das galhas), *Xiphinema* spp., *Pratylenchus* spp. (nematóide das lesões das raízes) e *Tylenchulus semipenetrans* (nematóide dos citros) (Manica & Pommer, 2006).

No Brasil, até o ano de 1998, as doenças bacterianas ocorriam de forma esporádica e sem causar prejuízos, em especial a galha da coroa, causado por *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium vitis*), que foi relatada em parreirais da região do Nordeste e nos Estados de Minas Gerais e São Paulo (Tavares et al., 2000). No entanto, em 1998, detectou-se pela primeira vez no Brasil a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Xcv) causando o cancro bacteriano em parreirais do Vale do Submédio São Francisco (Malavolta Jr. et al., 1999a; Lima et al., 1999a).

2- O CANCRO BACTERIANO DA VIDEIRA

2.1- Histórico e Distribuição Geográfica

O primeiro relato do cancro bacteriano da videira ocorreu na Índia em 1969, na variedade Anab-e-Shahi e seu agente causal foi descrito e classificado por Nayudu (1972) como *Pseudomonas viticola* sp. nov. A bactéria foi posteriormente reclassificada como *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Xcv) por Dye (1978), no entanto, sua importância só foi notada em 1983, quando causou perda substancial de rendimento na Índia. Nos anos de 1986-87, a doença apareceu de forma epidêmica nos parreirais coincidindo com os períodos de podas, ocasionando queda no rendimento, estimado entre 60 a 80% (Chand & Kishun, 1990). Atualmente, esta doença tem se tornado um

problema comum nas regiões de Maharashtra, North Karnataka e Andhra Pradesh na Índia (Jambenal, 2008).

No Brasil, em março de 1998, o cancro bacteriano foi detectado pela primeira vez em plantas de *V. vinifera*, variedade Red Globe em parreirais do Vale do Submédio São Francisco, município de Petrolina-PE (Malavolta Jr. et al., 1999a; Lima et al., 1999a). Sua introdução no Brasil, provavelmente, deve ter ocorrido através de estacas contaminadas da cultivar Red Globe provenientes da Índia. Uma vez introduzido, o patógeno encontrou na região de introdução, condições ideais de umidade e temperatura para seu desenvolvimento e disseminação (Almeida, 2002).

O segundo relato deste patógeno no Brasil ocorreu em maio de 1998, nas variedades Red Globe, Itália e Ribier em cultivos comerciais de *V. vinifera* na região de Teresina-PI (Malavolta Jr. et al., 1999b). Logo, focos da doença também foram observados ocorrendo nos municípios de Curaçá, Casa Nova, Sento Sé e Juazeiro da Bahia, nas variedades Festival, Brasil, Benitaka, Patrícia, Piratininga, Ribier, e Catalunha, com incidência bastante variável, sendo que, a variedade Itália mostrou-se mais tolerante (Lima et al., 1999a).

Em 2001, foi realizada inspeção em plantios do município de Jaguaruana-CE e comprovou-se a ocorrência do cancro bacteriano nas variedades Red Globe, Flame e Superior (Freire & Oliveira, 2001). Em julho de 2006, a presença de Xcv foi também detectada em parreirais em Boa Vista-RR (Halfeld-Vieira & Nechet, 2006) e Formosa-GO (Junqueira et al., 2006).

Em agosto de 2009, confirmou-se por testes de patogenicidade e moleculares, a presença de Xcv em parreirais de Red Globe em Tupi Paulista-SP. O procedimento de erradicação foi adotado e um levantamento foi realizado nas regiões produtoras do estado de São Paulo constatando que a bactéria é ausente no estado (Rodrigues Neto et al., 2011).

No ano de 2009 também foram encontradas plantas da variedade Red Globe, com sintomas típicos do cancro bacteriano no município de Cianorte-PR. Após confirmação da identidade do agente causal por meio de testes de patogenicidade e moleculares, as plantas foram erradicadas para evitar a disseminação do patógeno (Tomaz et al., 2011).

O cancro bacteriano da videira é uma das doenças de maior preocupação fitossanitária na região do Vale São Francisco. Além de causar queda na produtividade, impede o trânsito de material propagativo a partir dos estados onde a bactéria foi detectada (PE, BA e CE) e pode limitar o acesso da uva da região nos mercados interno e externo. A bactéria é considerada uma praga regulamentada, classificada como quarentenária presente (A2) - de importância econômica potencial, que não está amplamente distribuída no país, sujeita a programa oficial de controle de acordo com a Instrução Normativa nº 41, de 1 de julho de 2008 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Lopes & Nascimento, 2004; MAPA, 2008).

2.2- Sintomas

No Vale do Submédio São Francisco, a incidência e a severidade de sintomas da doença têm sido maior no primeiro semestre do ano, devido à ocorrência de chuvas, condição que propicia a disseminação e a penetração da bactéria na planta (Lima & Moreira, 2002). Nas folhas de plantas infectadas, há surgimento de pontos necróticos de 1 a 2 mm de diâmetro, circundadas ou não por halos amarelados, distribuídos no limbo foliar, entre as nervuras (Figura 1A), que podem coalescer, causando a necrose de grandes áreas da folha (Figura 1B) (Nascimento et al., 2000; Lima & Moreira, 2002).

Os sintomas podem surgir nas nervuras e pecíolos das folhas, como manchas escuras alongadas e irregulares (Figura 1C). Em ramos, há o desenvolvimento de

cancros, com fissuras longitudinais e coloração negra que, com o agravamento da infecção, alargam-se expondo os tecidos internos (Figura 1D). Nesses cancros, a bactéria permanece latente e inerte durante o período seco do ano e, com a ocorrência de chuvas, verifica-se abundante exsudação. A infecção pode atingir o sistema vascular da planta, tornando-se sistêmica (Nascimento et al., 2000; Lima & Moreira, 2002).

Na inflorescência ocorre necrose e os sintomas podem surgir a partir da extremidade em direção à base. Na ráquis dos frutos formam-se manchas escuras e alongadas semelhante aos observados em ramos (Figura 1E). As bagas são desuniformes em tamanho e cor, podendo apresentar lesões necróticas (Figura 1F) (Nascimento et al., 2000; Lima & Moreira, 2002).

Os sintomas causados por Xcv variam em intensidade, de acordo com a variedade da uva afetada. A variedade Red Globe e algumas variedades sem sementes, principalmente oriundas da ‘Thompson Seedless’, mostraram-se suscetíveis à doença. O principal prejuízo verificado nas variedades suscetíveis à doença é a redução na produção. Plantas infectadas, geralmente, produzem cachos com sintomas de cancro no engajo, inutilizando os frutos para comercialização (Lima & Moreira, 2002).

2.3- Etiologia e Diagnose

O agente causador do cancro bacteriano da videira, pertence ao Domínio *Bacteria*, Filo *Proteobacteria*, Classe *Gammaproteobacteria*, Ordem *Xanthomonadales*, Família *Xanthomonadaceae* e Gênero *Xanthomonas* (Garrity et al., 2004), embora tenha sido primeiramente identificada por Nayudu (1972) por meio de testes bioquímicos, fisiológicos e de patogenicidade como *Pseudomonas viticola* sp. nov. Em 1978, Dye a reclassificou no gênero *Xanthomonas*, como *X. campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye. Em 1995, Vauterin e colaboradores empregando a técnica de hibridização DNA-DNA,

propuseram a reclassificação de várias espécies do gênero *Xanthomonas*. Contudo, o patovar *viticola* não foi incluído neste estudo.

Takita et al., (2004) por meio da análise da região *rpf* de diferentes espécies e patovares de *Xanthomonas*, observaram que o patovar *viticola* não apresentou similaridade com de *X. campestris* pv. *campestris*, assim, indicando que o patovar *viticola* não pertenceria ao grupo de patovares de *X. campestris*. O sequenciamento de outras regiões mostrou maior similaridade do patovar *viticola* com *X. axonopodis* pv. *citri*, do que com *X. campestris* pv. *campestris* (Takita et al., 2004). Após análise de sequências genômicas de Xcv comparadas ao genoma completo de *X. axonopodis* pv. *citri*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. oryzae* pv. *oryzae* Takita et. al., (2006) observaram que o maior percentual de identidade de Xcv foi com *X. axonopodis*, assim sugerindo a realocação de Xcv para *X. axonopodis*. Marques (2007) analisando as sequências parciais de uma região com alta homologia ao gene *copA*, em algumas estirpes de Xcv, identificou maior similaridade com a sequência do gene de *X. axonopodis* pv. *citri* do que com *X. campestris* pv. *campestris*. Ferreira-Tonin et al., (2011) analisaram várias linhagens de *Xanthomonas* spp. por Multilocus Sequence Analysis (MLSA) e hibridização DNA-DNA que também evidenciaram a proximidade do pv. *viticola* com a espécie *X. axonopodis*. Contudo, até o presente, nenhuma proposta para reclassificação do patovar foi publicada.

A bactéria *X. campestris* pv. *viticola*, é gram-negativa, com dimensões de 0,6 x 1,2 - 2,5 µm, possui um único flagelo polar e metabolismo aeróbico (Nayudu, 1972). As colônias são arredondadas, convexas, brilhantes e de bordos lisos, com coloração esbranquiçada. A bactéria não produz pigmentos fluorescentes no meio B de King, é aeróbica, negativa para atividade de urease e oxidase, não utiliza asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio, não apresenta inclusões de poli-β-hidroxibutirato, e apresenta tolerância a concentrações entre 1 e 2 % de NaCl (Lima et al., 1999b).

Todavia, de acordo com Nascimento et al., (2005), Xcv cresceu nos meios contendo 1 a 5 % de NaCl e teve crescimento reduzido a partir de 2,5% e letal a 6,0%. A bactéria produz ácidos a partir de glucose, manose, galactose, trehalose, celobiose e frutose (Lima et al., 1999b), entretanto, Malavolta Jr. et al., (1999b) não detectaram a produção de ácidos a partir de celobiose. Apresenta crescimento médio (entre 48 e 72 horas) a 28-33 °C, mas não a 41 °C (Malavolta Jr. et al., 1999a; Lima et al., 1999b). Nascimento et al., (2005) revelaram que o crescimento ótimo ocorreu entre 27-29 °C, não crescendo a 0 °C e a 40 °C. O pH ótimo é de 7,5 (Nascimento et al., 2005). A reação de hipersensibilidade é negativa em folhas de fumo (*Nicotiana tabacum* L. cv. White Burley), mas positiva em folhas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara) (Malavolta Jr. et al., 1999b).

A diagnose do cancro bacteriano da videira pode ser feita com base na avaliação dos sintomas, isolamento em meio de cultura, realização de testes bioquímicos e testes de patogenicidade, no entanto, esses métodos apresentam limitações em função do tempo gasto e da dificuldade de se fazer a diagnose precoce em material assintomático (Trindade, 2007).

Com a intenção de desenvolver métodos de diagnóstico mais eficazes e rápidos para a diagnose dessa bacteriose, Araújo et al., (2005) produziram anticorpos policlonais que se mostraram altamente reativos contra o patógeno, podendo ser empregados no diagnóstico da doença. Concomitantemente, Trindade et al., (2007) realizaram a amplificação de fragmento de 840 pb do gene *hrpB* do DNA genômico de Xcv com os iniciadores RST2 e RST3 (Leite et al., 1994) e posterior sequenciamento. Três iniciadores (Xcv1F, Xcv2R e Xcv3R) foram desenhados e testados em cinco combinações com os iniciadores externos RST2 e RST3. As combinações RST2/Xcv3R (produto amplificado de 340 pb) e Xcv1F/Xcv3R (240 pb) foram selecionadas por não gerarem bandas secundárias, apresentarem boa reprodutibilidade e amplificação positiva

com todos os isolados testados de Xcv. Estes iniciadores foram testados quanto à especificidade e sensibilidade para detecção de Xcv. Com os dois pares de iniciadores a amplificação foi positiva com o DNA de 44 isolados de Xcv, mas também com quatro isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* e cinco de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. Entretanto, a digestão dos produtos de PCR com a enzima *Hae* III permitiu diferenciar Xcv dos isolados desses patovares. Nenhum dos dois pares de iniciadores amplificou o DNA de videira, nem de 20 bactérias não patogênicas isoladas da flora da videira, ou de 10 isolados de outros seis gêneros de bactérias fitopatogênicas. A sensibilidade dos iniciadores Xcv1F/Xcv3R e RST2/Xcv3R foi de 10 pg e 1 pg de DNA purificado de Xcv, respectivamente. O limite de detecção de RST2/Xcv3R foi de 10^4 ufc/ml, mas empregando-se uma segunda rodada de amplificação com o iniciador interno Xcv1F, esse limite foi de 10^2 ufc/ml.

Peixoto et al., (2006) formularam um meio de cultura semi-seletivo, NYDAM (NYDA + ampicilina) composto de: extrato de carne, peptona, glicose, extrato de levedura, agar e ampicilina, para isolamento de Xcv. Constatou-se que, além de facilitar o isolamento de Xcv, também houve inibição de bactérias saprófitas e fitopatogênicas.

2.4- Epidemiologia

O cancro bacteriano da videira é caracterizado como uma doença de comportamento dinâmico e agressivo. O seu surgimento é beneficiado por condições de umidade e temperatura elevadas, além de ferimentos na planta (Tavares et al., 2000; Lima, 2000).

A bactéria pode sobreviver epifiticamente em órgãos da parte aérea, sendo responsável pela manutenção de inóculo na ausência de condições predisponentes à infecção, mantendo a planta infectada com Xcv de um ciclo para outro (Lima, 2000;

Araújo, 2001). A partir da análise de fotomicrografias obtidas de órgãos aéreos de videira, Araújo (2001) observou que Xcv reside sobre folhas doentes com ou sem sintomas, em áreas de produção de uva do Submédio São Francisco. Nos cancos presentes em plantas doentes, principalmente, em ramos e, em restos de material vegetal, o patógeno permanece latente e inerte durante o período seco (Figura 2). Com a ocorrência de chuvas, há abundante exsudação a partir desses cancos, o que favorece a disseminação da bactéria e o surgimento de novos focos de infecção. A sobrevivência deste patógeno pode também estar relacionada a cancos ativos presentes no material vegetativo podado e remanescente no pomar (Lima, 2000; Lima, 2008).

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

No Brasil, segundo Peixoto et al., (2007), a infecção natural de Xcv foi observada em plantas invasoras de *Alternanthera tenella* (alecrim, Amaranthaceae), *Amaranthus* sp. (caruru, Amaranthaceae), *Glycine* sp. (soja perene, Fabaceae) e *Senna obtusifolia* (fedegoso, Leguminosae) coletadas em parreirais de Juazeiro e Petrolina. Em ambiente controlado e utilizando a inoculação artificial, as seguintes espécies de plantas invasoras também reproduziram os sintomas causados por Xcv: *Chamaesyce hirta* (burra-leiteira, Euphorbiaceae), *Dactyloctenium aegyptium* (capim mão-de-sapo, Poaceae), *Eragrostis pilosa* (capim barbicha-de-leão, Poaceae), *Commelina benghalensis* (trapoeraba, Commelinaceae) e *Pilea* sp. (brilhantina, Urticaceae) (Peixoto et al., 2007).

Araújo et al., (1999) também realizaram inoculações artificiais em mangueira (*Mangifera indica*), cajueiro (*Anacardium occidentale*), cajá-manga (*Spondias dulcis*), umbuzeiro (*Spondias tuberosa*) e aroeira (*Schinus terebenthifolius*), pertencentes à família Anacardiaceae, que resultaram em sintomas característicos, apesar de infecções

naturais não terem sido registradas nessas espécies. Em contrapartida, por de inoculações artificiais da bactéria, Braga & Ferreira, (2000) não observaram sintomas da doença em plantas de fumo, cebola, tomate, beterraba, cenoura, repolho, pepino, soja, feijão e alface.

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

Um dos principais meios de disseminação da doença a longas distâncias é o material propagativo de copa e porta-enxerto infectado e utilizado em enxertia e na formação de mudas. Entre as plantas do mesmo parreiral ou entre áreas próximas, a disseminação é favorecida por ventos fortes associados a chuvas, o que pode, também, causar ferimentos em folhas, propiciando a entrada da bactéria na planta. Respingos de chuva ou irrigação sobrecopa, podem veicular propágulos de bactéria de uma planta para outra. Pode ocorrer, ainda, durante a torção de ramos, em tesouras de poda e em canivetes utilizados em enxertias. Tratos culturais que resultam em ferimentos como desbrotas e podas, realizadas no período chuvoso, em cultivares suscetíveis, podem propiciar a ocorrência de novas infecções no parreiral (Lima, 2008).

O vento seco não dissemina a bactéria, sendo necessária sempre a presença de água. Operações que ocasionam ferimentos, como desbrota e poda, realizadas nessa fase, em cultivares suscetíveis, podem propiciar o surgimento de infecção nas plantas. A irrigação sobrecopa, como a aspersão convencional e o pivô central, favorecem o desenvolvimento da doença (Lima, 2000; 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 (Figura 2). Araújo e colaboradores (2004) por meio de imunomarcção com partículas de ouro confirmaram a presença da bactéria em ramos e folhas de videira com e sem sintomas do cancro, revelando a intensa colonização de Xcv no parênquima xilemático e vasos condutores. Com o desenvolvimento 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. Fatores como temperaturas em torno de 25 a 30 °C e alta umidade relativa do ar proporcionam condições favoráveis ao desenvolvimento da doença (Nascimento & Mariano, 2004; Mariano et al., 2001).

Os sintomas em variedades suscetíveis são notados 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).

2.5- Controle

Considerando-se a complexidade do controle e a natureza da infecção, as recomendações de controle baseiam-se principalmente na adoção de medidas preventivas tais como: o uso de material de propagação sadio com Certificado Fitossanitário de Origem – CFO (Instrução Normativa nº 55, 2007); estabelecimento de quebra-ventos; evitar o trânsito de pessoas e equipamentos de áreas afetadas para áreas sem ocorrência da bactéria, sem as devidas medidas profiláticas; desinfestação de veículos, máquinas, implementos, equipamentos e material de colheita com amônia quaternária (Quatermon 1 litro /1000 litros de água) após cada utilização. Ressalta-se, no entanto, que esse produto é considerado potencialmente prejudicial ao meio ambiente

segundo Jaenisch et al., (2007). Nesse contexto, Souza et al., (2010), testaram o ácido peracético que é altamente compatível com o meio ambiente e concluíram que o ácido peracético a uma concentração de 3.450 µg mL⁻¹ inibe eficientemente o crescimento *in vitro* de Xcv. Outras medidas preventivas são recomendadas de forma a interferir na dispersão da doença, tais como: retirar da área com ocorrência da bactéria todo material de poda e material com sintoma e queimar; efetivar inspeções periódicas nos parreirais, pois a verificação da ocorrência da doença nos estágios iniciais facilita o seu manejo; as podas devem sempre ser realizadas com ferramentas desinfestadas; evitar poda durante o período chuvoso; e eliminar possíveis hospedeiros alternativos do patógeno (Instrução Normativa nº 9, de 2006; Nascimento & Mariano, 2004).

Doenças de plantas causadas por bactérias são de difícil controle e, até o momento, para o controle químico recomenda-se pulverizar as plantas com produtos a base de cobre logo após a poda, brotação e quando há a ocorrência de ferimentos, uma vez que, ainda não há produtos registrados no MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) para este fim. Segundo Tavares et al., (2000), os fungicidas cúpricos e alguns tiocarbamatos podem atuar na proteção de plantas à infecção causada por bactérias, o quais podem atuar retardando, inibindo ou bloqueando a multiplicação do patógeno, devido ao seu efeito bacteriostático ou bactericida. A utilização somente de compostos a base de cobre nem sempre é eficaz ao tratamento da doença, pois estirpes de Xcv apresentaram variabilidade na tolerância ao cobre (Marques et al., 2009).

Novas formas de controle estão sendo estudadas e de acordo com Oliveira et al., (2010), óleo e extratos vegetais e sais orgânicos e inorgânicos foram testados sobre o crescimento de bactérias fitopatogênicas, incluindo Xcv, e resultaram na inibição de todas as bactéria testadas pelo extrato de alho e metabissulfito.

A busca de fontes de resistência de videira ao cancro bacteriano, também, tem sido estudada. Chand (1992) avaliou a resistência genética de 14 espécies de *Vitis*; espécies de sete gêneros da família Vitaceae e 73 variedades de *V. vinifera* e *V. labrusca* em condições de infecção natural e inoculação artificial. *V. vinifera* foi altamente suscetível, outros gêneros de Vitaceae e algumas espécies de *Vitis* foram altamente resistentes. Variedades de *V. vinifera* sem sementes foram mais suscetíveis que aquelas com sementes e entre estas, as variedades coloridas mostraram-se mais suscetíveis que as brancas.

Aguiar et al., (2001) avaliando diferentes de genótipos de videira quanto à resistência a Xcv, notaram que dentre as variedades testadas, as que apresentaram menor índice de infecção causado pelo patógeno foram *V. shuttleworthii*, Seyne Villard e *V. Jacquemonti*.

Por meio de inoculações artificiais de Xcv nas variedades Red Globe, Benitaka, Rubi, Itália, Niagara Branca e Niagara Rosada, Malavolta Jr. et al., (2003) mostraram que as variedades avaliadas diferiram quanto ao grau de suscetibilidade 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, Itália) apresentaram os maiores índices de severidade de doença, sendo a variedade Red Globe, que apresentou o maior índice de severidade. Apesar das variedades de *V. vinifera* terem se mostrado mais suscetíveis a esse patógeno, as informações deste trabalho indicam que esse patógeno também pode infectar os híbridos de *V. labrusca* x *V. vinifera*.

Conforme a Instrução Normativa nº 9, de 20 de abril de 2006, as variedades Niagara Rosada e Branca e Princês possuem baixo grau de suscetibilidade; Thompson, Benitaka, Festival, Sonaka, Itália e Rubi possuem médio grau; e a Red Globe possui alto grau de suscetibilidade.

Nascimento et al., (2006) avaliaram a reação de 20 clones de videira quanto a resistência ao patógeno em casa de vegetação e verificaram que a variedade Brasil apresentou os maiores níveis de doença para todas as variáveis testadas, enquanto Isabel e Paulsen 1103 destacaram-se com os maiores valores de período de incubação e os menores valores de incidência de folhas com sintomas. Os autores observaram que, entre as variáveis estudadas, qualquer uma delas pode ser utilizada em pesquisas envolvendo reação de clones de videiras ao cancro bacteriano.

3- JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O cancro bacteriano da videira causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* é responsável por grandes prejuízos ao cultivo da videira no Vale do Submédio São Francisco. Diante da necessidade da detecção precoce do patógeno em plantas assintomáticas e do uso de material de propagação livre do patógeno, como uma medida para evitar sua disseminação para novas áreas, este estudo teve como objetivo principal:

- Otimizar e ajustar a técnica de PCR com os iniciadores previamente descritos por Trindade et al., (2007) para detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em tecidos assintomáticos de videira.

Foram os objetivos específicos:

- Determinar o limite mínimo de detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* por PCR em cachos e folhas utilizando Nested-PCR e BIO-PCR com meio semi-seletivo NYDAM.
- Determinar metodologia mais eficiente para recuperação de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* de cachos e folhas sem sintomas.
- Comparar a eficiência de BIO-PCR x Nested-PCR, avaliando-se tempo gasto, sensibilidade e facilidade de uso.

- Desenvolver um controle interno da PCR para falsos negativos.
- Validar o método com mudas inoculadas em casa de vegetação, mudas em viveiros e plantas em áreas de produção no Vale do Submédio São Francisco.

Tabela 1. Produção de uvas (em toneladas) no Brasil nos anos de 2007 a 2010, distribuída pelos principais estados produtores

Estado/Ano	2007	2008	2009	2010
Pernambuco	170.326	162.977	158.515	168.525
Bahia	120.654	101.787	90.508	78.283
Minas Gerais	11.995	13.711	11.773	10.590
São Paulo	193.023	184.930	177.934	177.538
Paraná	99.180	101.500	102.080	101.900
Santa Catarina	54.554	58.330	67.546	66.214
Rio Grande do Sul	705.228	776.027	737.363	692.692
Brasil	1.354.960	1.399.262	1.345.719	1.295.442

Fonte: IBGE e Mello (2010).

Tabela 2. Área cultivada (em hectares) de videira no Brasil nos anos de 2007 a 2010, distribuída pelos principais estados produtores

Estado/Ano	2007	2008	2009	2010
Pernambuco	7.137	7.083	7.104	8.801
Bahia	4.096	4.376	3.724	3.273
Minas Gerais	878	911	854	853
São Paulo	11.039	10.717	9.750	9.750
Paraná	5.700	5.800	5.800	5.800
Santa Catarina	4.915	4.836	4.937	5.052
Rio Grande do Sul	48.428	49.819	50.415	50.389
Brasil	84.220	83.542	82.584	83.718

Fonte: IBGE e Mello (2010).

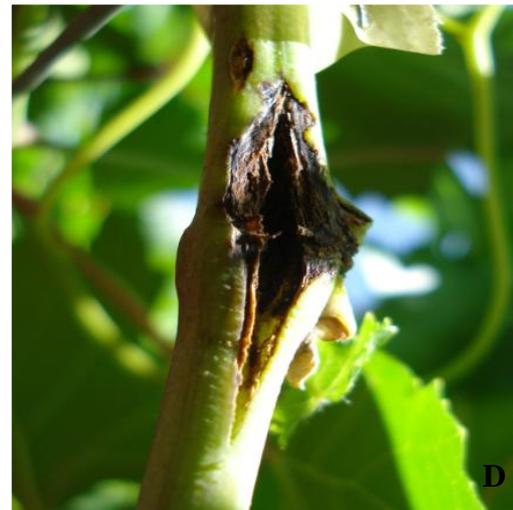
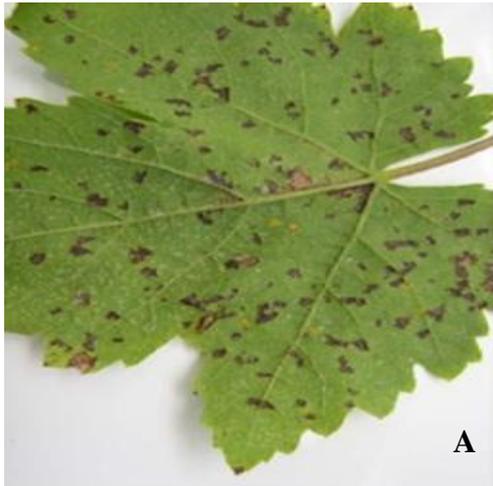


Figura 1. Sintomas do cancro bacteriano da videira, causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*: **A.** Pontos necróticos na folha; **B.** Morte de áreas do limbo foliar; **C.** Necrose nas nervuras e pecíolo da folha; **D.** Cancro no ramo; **E.** Cancro na ráquis; **F.** Necrose em baga. **A, E e F.** fotos de L.C.Trindade; **B.** extraído de Halfeld-Vieira et al., 2008; **C.** extraído de Lima et al., 2002; e **D.** foto de A.C. Freitas.

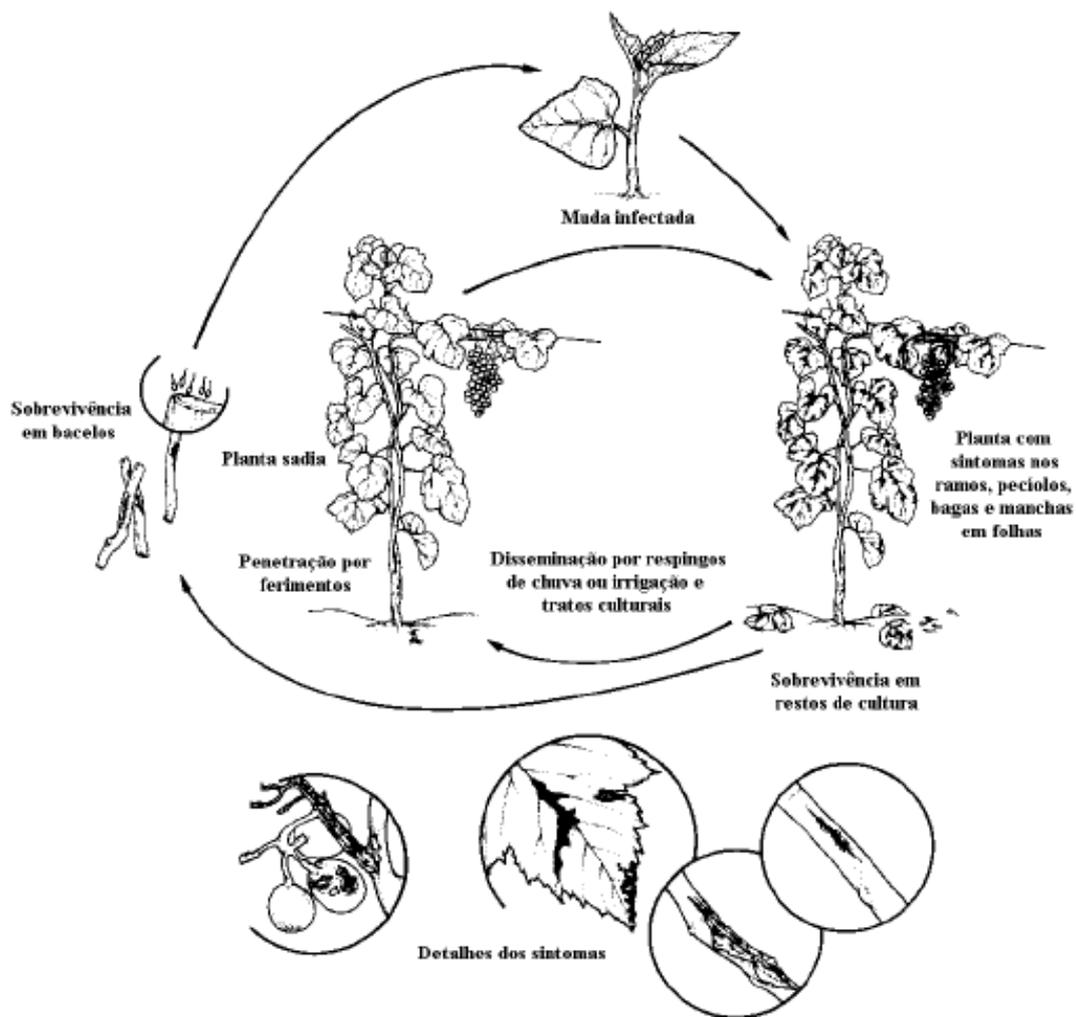


Figura 2. Ciclo do cancro bacteriano causado pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videira (extraído de Mariano et al., 2001)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar IF, Silva VAV, Castra GSS, Nascimento ARP, Paz CD (2001) Resistência a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em cultivares de videira no Vale do São Francisco. *Fitopatologia Brasileira* 26:282.

Almeida IG (2002) O Cancro bacteriano da videira no Brasil. *Anais da VII Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico – Frutas*. pp. 66-74.

Araújo JSP, Robbs CF, Maciel GF (1999) Novos hospedeiros alternativos de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* no Brasil. *Summa Phytopathologica* 25(1):83.

Araújo JSP (2001) 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. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ.

Araújo JSP, Oliveira BC; Olivares FL, Reis Junior FB, Cruz GB, Robbs CF, Ribeiro RLD (2004) Imunomarcção de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* com ouro utilizando anticorpos policlonais. *Agronomia* 38:29-33.

Araújo JSP, Reis Júnior FB, Cruz GB, Oliveira BC, Robbs CF, Ribeiro R LD, P JC (2005) Produção e caracterização de anticorpos policlonais contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40:305-309.

Braga JP, Ferreira MASV (2000) 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.

Chand R, Kishun R (1990) Outbreak of grapevine bacterial canker disease in India. *Vitis*, 29(3): 183-188.

Chand R (1992) Sources of resistance to grapevine bacterial canker disease in *Vitis*. *Vitis* 31:83-86.

Dye DW (1978) Genus *Xanthomonas* Dowson 1939. In Young JM, Bradbury JF, Panagopoulos CG, Robbs CF (Eds.) A proposed nomenclature and classification for pathogenic bacteria. N.Z.J. Agric. Res 21. pp. 153-177.

Ferreira-Tonin M, Corrêa DBA, Destéfano SAL (2011) Classificação de linhagens de *Xanthomonas* sp. por Multilocus Sequence Analysis (MLSA) e hibridização DNA-DNA. *Tropical Plant Pathology* 36:128.

Freire FCO, Oliveira ADS (2001) Ocorrência do cancro bacteriano da videira no Estado do Ceará. Fortaleza, CE. Embrapa. Comunicado Técnico 62.

Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG (2004) Bergy's manual of systematic bacteriology. Michigan State University. 2nd Ed.

Halfeld-Vieira BA, Nechet LK (2006) Bacterial canker of grapevine in Roraima, Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 31:604.

Halfeld-Vieira BA, Nechet LK (2008) Doenças da videira no Estado de Roraima. Boa Vista, RR. Embrapa Roraima. Documentos 04.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) (2011) Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Pesquisa Mensal de Previsão e Acompanhamento das Safras Agrícolas no Ano Civil. Rio de Janeiro: v. 24, n. 2, 182 p.

Jaenisch FRF, Kuchiishi SS, Coldebella A (2007) Comparação da atividade antibacteriana de desinfetantes com potencial uso na produção orgânica de aves. Concórdia. Embrapa. Comunicado Técnico 468.

Jambenal S (2008) Studies on bacterial leaf spot of grape caused by *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye in northern Karnataka. Master of Science (Agriculture) in Plant Pathology. University of Agricultural Sciences, Dharwad.

Junqueira NTV, Junqueira KP, Braga MF, Vaz CF, Santos EC, Junqueira LP, Souza LS, Lima CA (2006) Ocorrência do cancro bacteriano da videira na região do entorno do Distrito Federal. *Frutas do Brasil: Saúde para o Mundo*. p. 323.

Leão PCS (2000) Principais variedades. In: Leão PCS, Soares JM (Eds.) *A viticultura no semi-árido brasileiro*. Petrolina: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). pp. 45-64.

Leão PCS, Possídio EL (2000) Histórico da videira. In: Leão PCS, Soares JM (Eds.) A viticultura no semi-árido brasileiro. Petrolina: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). pp. 13-17.

Leite Jr. RP, Minsavage GV, Bonas U, Stall RE (1994) Detection and identification of phytopathogenic *Xanthomonas* strains by amplification of DNA sequences related to the *hrp* genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Applied and Environmental Microbiology 60:1068-1077.

Lima MF, Ferreira MASV, Moreira AW, Dianese JC (1999a) Bacterial canker of grapevine in Brazil. Fitopatologia Brasileira 24(3):440-443.

Lima MF, Ferreira MASV, Dianese JC (1999b) Situação do cancro bacteriano da videira causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* no Submédio do Vale do São Francisco. Fitopatologia Brasileira 24:250.

Lima MF (2000) Cancro bacteriano da videira, Causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*: Epidemiologia e manejo. Petrolina, PE. Embrapa Semi-Árido. Circular Técnica 54.

Lima MF, Moreira WA (2002) Uva de mesa: Fitossanidade (Frutas do Brasil). Doenças Causadas por bactérias Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. pp. 27-34.

Lima MF (2008) Doenças que comprometem a produção e a comercialização da uva. In: I Simpósio internacional de vitivinicultura do Submédio São Francisco. Pernambuco. Embrapa Semi-árido. pp. 13-14.

Lopes DBL, Nascimento ARP (2004) Situação atual do cancro bacteriano da videira no semi-árido nordestino. Petrolina, PE. Embrapa Semi-árido. Documento 185.

Malavolta Junior VA, Almeida IMG, Sugimori MH, Ribeiro IJA, Rodrigues Neto J, Pires EJP, Nogueira EMC (1999a) Ocorrência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videira no Brasil. Summa Phytopathologica 25:262-264.

Malavolta Jr. VA, Almeida JMG, Sugimori M.H, Ribeiro IJA, Rodrigues Neto J, Pires EJP, Nogueira EMC (1999b) *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videira no Estado do Piauí. Summa Phytopathologica 25:89.

Malavolta Junior VA, Sugimori MH, Almeida IMG, Ribeiro IJA (2003) Resistência de variedades de videira a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. Arquivo do Instituto Biológico. São Paulo. 70(3):373-376.

Manica I, Pommer CV (2006) Uva: do plantio a produção, pós-colheita e mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes. pp. 159-176.

MAPA (2006) Instrução Normativa nº 9. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 20 nov 2011.

MAPA (2007) - Instrução Normativa Nº 55. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 20 nov 2011.

MAPA (2008) - Instrução Normativa Nº 41. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 20 nov 2011.

Mariano RLR, Silveira EB, Assis SMP, Gomes AMA, Oliveira IS, Nascimento ARP (2001) Diagnose e manejo de fitobacterioses de importância no Nordeste Brasileiro. In: Michereff SJ, Barros R (Eds.) Proteção de plantas na agricultura sustentável. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária. pp. 160-169.

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

Marques E, Uesugi CH, Ferreira MASV (2009) Sensitivity to copper in *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Tropical Plant Pathology* 34(6):406-411.

Mello LMR (2009) Área e produção de uvas: Panorama mundial. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/producaomundial.pdf>>. Acesso em: 08 set 2010.

Mello LMR (2010) Vitivinicultura brasileira: panorama 2010. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/prodvit2010.pdf>>. Acesso em: 28 abr 2011.

Nachtigal JC (2003) Avanços tecnológicos na produção de uvas de mesa. In: Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia. Bento Gonçalves, RS. Embrapa uva e vinho. pp. 167-170.

Nascimento ARP, Mashima CH, Lima MF (2000) Cancro bacteriano: nova doença da videira no Submédio São Francisco. Petrolina, PE. Embrapa Semiárido. Circular Técnica 58.

Nascimento ARP, Mariano RLR (2004) Cancro bacteriano da videira: etiologia, epidemiologia e medidas de controle. *Ciência Rural* 34 (1):301-307.

Nascimento ARP, Mariano RLR, Gama MAS (2005) Método de preservação e crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em meio de cultura variando temperatura, pH e concentração de NaCl. *Fitopatologia Brasileira* 36(6):650-654.

Nascimento ARP, Michereff SJ, Mariano RLR, Viana IO (2006) Reação de clones de videira a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, baseada nos componentes epidemiológicos do cancro bacteriano. *Ciência Rural* 36(1).

Nayudu MV (1972) *Pseudomonas viticola* sp. nov., incitant of a new bacterial disease of grapevine. *Phytopathologische Zeitschrift* 73:183-186.

Oliveira JEM, Lopes PRC, Haji FNP, Moreira AN, Miranda JR (2008/2009) Produção integrada de uva no Vale do São Francisco. In: Zambolim L, Nasser LCB, Andrigueto JR, Teixeira JM, Fachinello JC, Kososki A (Eds.) *Produção integrada no Brasil*. Brasília: MAPA. pp. 913-934.

Oliveira WJ, Santana WS, Félix KCS, Silveira EB, Mariano RLR (2010) Ação de óleo e extratos vegetais e sais sobre bactérias fitopatogênicas importantes em Pernambuco. JEPEX 2010, UFRPE, Recife, PE.

Peixoto AR, Mariano RLR, Viana IO (2006) Meio semi-seletivo para isolamento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. Ciência Rural 36 (14):1317:1320.

Peixoto AN, Mariano RLR, Moreira JOT, Viana IO (2007) Hospedeiros Alternativos de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. Fitopatologia Brasileira 32 (2):161-164.

Robbs CF, Rodrigues Neto J (1999) Enfermidades causadas por bactérias em frutíferas tropicais no Brasil. Summa Phytopathologica 25: 47-52.

Rodrigues Neto J, Destéfano SAL, Rodrigues LMR, Peloso DS, Oliveira Júnior LC (2011) Grapevine bacterial canker in the State of São Paulo, Brazil: detection and eradication. Tropical Plant Pathology 36 (1):42-44.

Silva PCG, Correia RC (2000) Caracterização social e econômica da videira. In: Leão PCS, Soares JM (Eds.) A viticultura no semi-árido brasileiro. Petrolina: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). pp. 19-32.

Souza LNJ, Alves AO, Santos LA, Oliveira MMS, Gama MAS, Barbosa MAG, Mariano LRL (2010) Efeito do ácido peracético no crescimento in vitro de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. JEPEX 2010, UFRPE, Recife, PE.

Takita MA, Souza A, Borges KM, Coleta-Filho HD, Rodrigues Neto J, Machado MA (2004) Região rpf (regulação de fatores de patogenicidade) distingue espécies de *Xanthomonas*. *Fitopatologia Brasileira* 29: S254.

Takita MA, Borges KM, Reis MS, Destéfano SAL, Machado AM (2006) Analysis of genomic sequences of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* gives support to a taxonomic reclassification. XXXV Reunião anual da SBBq. Resumo ID: 0968.

Tavares SCCH, Lima MF, Melo NF (2000) Principais doenças da videira e alternativas de controle. In: Leão PCS, Soares JM (Eds.) A viticultura no Semi-árido brasileiro. Petrolina: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), 2000. pp. 293-346.

Tomaz R, Scremin RM, Ferreira MASV, Barbosa MAG (2011) Detecção e erradicação de videiras com sintomas do cancro bacteriano no Estado do Paraná. *Tropical Plant Pathology* 36: 136.

Trindade LC (2007) Diagnose molecular do cancro bacteriano da videira causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília, DF.

Trindade LC, Marques E, Lopes DB, Ferreira MASV (2007) Development of a molecular method for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Summa Phytopathologica* 33(1):16-23.

Vauterin L, Hoste B, Kersters K, Swings J (1995) Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45(5):472-489.

CAPÍTULO 2

DETECÇÃO MOLECULAR DE *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*

EM VIDEIRAS ASSINTOMÁTICAS

DETECÇÃO MOLECULAR DE *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* EM VIDEIRAS ASSINTOMÁTICAS

Anna Cristina de Freitas¹, Tatiana David Miranda¹, Maria Angélica Guimarães Barbosa², Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira¹

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, 79919-970, Brasília, DF, Brasil; ²Embrapa Semiárido, 56302-970, Petrolina, PE, Brasil

RESUMO

O cancro bacteriano da videira, causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Xcv) Nayudu (Dye), foi detectado no Brasil pela primeira vez em 1998, em plantas de *Vitis vinifera*, variedade Red Globe, em Petrolina, Pernambuco. A doença é responsável por prejuízos ao cultivo da videira no Vale do Submédio São Francisco, apresentando incidência expressiva e importância econômica. Uma das medidas mais eficazes para conter sua disseminação para novas áreas é o uso de material de propagação livre do patógeno. Este estudo teve como objetivo geral otimizar a técnica de PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) para detecção de Xcv em tecidos assintomáticos de videira. Foram objetivos específicos: determinar o limite mínimo de detecção por BIO-PCR aliado ao uso de meio semi-seletivo NYDAM e por Nested-PCR em frutos e folhas inoculados e assintomáticos; desenvolver um controle interno para falsos negativos e validar a BIO-PCR e a Nested-PCR em mudas de viveiros e em plantas sintomáticas e assintomáticas de áreas de produção no Vale do Submédio São Francisco. A determinação do limite mínimo de detecção de Xcv por BIO-PCR e Nested-PCR foi realizada com a inoculação de Xcv em frutos e folhas de videira nas concentrações de

10^2 a 10^8 ufc/ml. O limite mínimo de detecção por BIO-PCR em frutos e folhas foi de 10^2 ufc/ml. Com a Nested-PCR o limite mínimo de detecção em frutos foi de 10^2 ufc/ml e de 10^3 ufc/ml em folhas. Para o desenvolvimento do controle interno, foram incluídos iniciadores universais para o gene do 16S rRNA de bactérias (F984/1492) em reações multiplex com os iniciadores Xcv1F/Xcv3R. Amplificação dos dois fragmentos esperados ocorreu com DNA purificado de Xcv e com amostras positivas (lavados de folhas) por BIO-PCR e Nested-PCR. Contudo, em 16 amostras negativas por Nested-PCR, apenas em uma ocorreu a amplificação do fragmento correspondente ao gene de 16SrRNA. Na validação dos métodos em áreas de produção com histórico da doença, 97% das amostras coletadas com sintomas foram positivas por BIO-PCR e 69,7% positivas por Nested-PCR. Entre as amostras sem sintomas, a detecção de Xcv só foi possível por BIO-PCR (29,7 % das amostras). De 60 amostras de mudas assintomáticas coletadas em dois viveiros na região, detectou-se Xcv por BIO-PCR em três amostras (5%) de um dos viveiros.

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

ABSTRACT

Bacterial canker of grapevine, caused by *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Xcv) Nayudu (Dye), was detected in Brazil in 1998, affecting plants of *Vitis vinifera*, cultivar Red Globe, in Petrolina, Pernambuco State. This disease is responsible for economic losses in vineyards in the São Francisco river valley, northeastern Brazil. One of the most effective measures to prevent its dissemination to new areas is the use of pathogen-free propagating material. The objective of the present study was to optimize the PCR (polymerase chain reaction)-based method to detect Xcv in asymptomatic

grapevine tissues. The specific objectives were: to determine the minimum detection limits of BIO-PCR combined with the use of the semi-selective medium NYDAM and of Nested-PCR in inoculated and asymptomatic fruits and leaves; to develop an internal control for false negatives; and to validate the BIO-PCR and Nested-PCR methods by testing asymptomatic plants from nurseries and symptomatic and asymptomatic plants from grapevine-producing areas in the São Francisco river valley. The detection limit of BIO-PCR and Nested-PCR was performed by inoculating Xcv in grapevine fruits and leaves, at concentrations from 10^2 to 10^8 cfu/ml. The lower detection limit of BIO-PCR in fruits and leaves was 10^2 cfu/ml. Using Nested-PCR, the detection limit in fruits was 10^2 cfu/ml, and 10^3 cfu/ml in leaf samples. To develop the internal control for PCR, universal primers for bacterial 16S rRNA gene (F984/1492) were included in multiplex reactions with primer pair Xcv1F/Xcv3R. Amplification of the two expected fragments occurred with purified Xcv DNA and with samples (washes from leaves) tested positive by BIO-PCR and Nested-PCR. However, only one out of 16 samples tested negative by nested-PCR yielded the 16SrRNA amplicon. When validating the methods in production areas with a history of the disease, 97% of the symptomatic samples were positive by BIO-PCR and 69.7% positive by Nested-PCR. Among asymptomatic samples, detection of Xcv was possible only by BIO-PCR (29.7% of samples). Among 60 samples from asymptomatic plants collected in two nurseries in the region, Xcv was detected by BIO-PCR in three samples (5%) from one of the nurseries.

Keywords: *Vitis vinifera*, PCR, diagnosis, bacterial canker of grapevine

1. INTRODUÇÃO

O cancro bacteriano da videira é uma das doenças que mais ameaçam a estabilidade fitossanitária da cultura no Submédio São Francisco. O seu agente

causador, *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Xcv), foi provavelmente introduzido no Brasil por meio de material propagativo originário da Índia (Almeida, 2002). A bactéria é considerada uma praga regulamentada, classificada como quarentenária presente (A2), com ocorrência restrita aos Estados de Pernambuco, Bahia e Ceará (Instrução Normativa nº 41/2008), logo há grande preocupação com o risco de disseminação da bactéria para outras regiões produtoras de uvas no Brasil através de material propagativo contaminado.

Nesse contexto, o diagnóstico precoce da doença torna-se uma importante ferramenta na prevenção da disseminação de Xcv. A diagnose do cancro bacteriano pode ser realizada por meio de técnicas convencionais como: observação de sintomas, isolamento da bactéria em meio de cultura, realização de testes bioquímicos, culturais, fisiológicos e testes de patogenicidade (Malavolta et al., 1999; Peixoto et al., 2006). Detectar e identificar Xcv em plantas de videira sintomáticas por meio de técnicas tradicionais pode ter custos mais baixos, porém, consomem mais tempo para sua realização e não podem ser aplicados para plantas assintomáticas. Em compensação métodos sorológicos e moleculares são mais específicos, sensíveis e podem acelerar o processo de diagnóstico.

Para a diagnose do cancro bacteriano através da sorologia, Araújo et al., (2005) desenvolveram anticorpos policlonais que se revelaram reativos e específicos para uso na detecção de Xcv. A sensibilidade de detecção com os anticorpos produzidos variou de 10^4 a 10^6 ufc/ml, e os autores também verificaram a existência de reações cruzadas com os patovares: *vesicatoria*, *campestris* e *mangiferaeindicae*, entre 20 e 30 %.

Tecnologias baseadas em DNA, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), permitem que regiões do genoma do patógeno sejam amplificadas milhões de vezes, aumentando assim a sensibilidade de detecção (Vincelli & Tisserat, 2008). Permite maior rapidez e agilidade na detecção e identificação do patógeno quando comparado

aos métodos convencionais (Harmon et al., 2003; Martin & Tooley, 2004; Zhang et al., 2006; Peres et al., 2007).

A PCR é uma técnica conhecida por ser altamente sensível na detecção do DNA (Wiglesworth et al., 1994; McCartney et al., 2003). No entanto, a sua sensibilidade pode ser aumentada de várias maneiras. Uma delas é através da BIO-PCR que consiste em promover a multiplicação das células bacterianas presentes numa amostra por incubação em meios de cultura antes da PCR (Schaad et al., 1995). Esta técnica apresenta ainda, comparada à PCR tradicional, a possibilidade de eliminação de diversos inibidores de PCR e a detecção unicamente de células cultiváveis (Moura et al., 2005).

A BIO-PCR tem sido utilizada para a detecção de diversos patógenos bacterianos (Song et al., 2004; Fatmi et al., 2005). Em mudas de tomateiro, foi possível detectar *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* por meio desta técnica, em 95% das amostras, três dias após a inoculação e a uma distância de oito cm de distância do local inoculado (Burokiene, 2006). Singh & Dhar (2011) também relataram a detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em folhas de crucíferas por meio de BIO-PCR, dentro de 3-4 dias após a inoculação. Estes resultados indicam a possibilidade de detectar o patógeno em estágios muito iniciais da infecção. Em videiras, a BIO-PCR foi empregada para a detecção da bactéria *Xylella fastidiosa* em folhas e pecíolos de videira com sintomas do mal de Pierce. Os resultados mostraram que após cinco dias de incubação foi possível recuperar e identificar a bactéria em 79 % das amostras (Fatmi et al., 2005).

Outra variação da PCR que pode aumentar a sensibilidade de detecção é a Nested-PCR, que se baseia em duas rodadas consecutivas de PCR, onde na segunda etapa de amplificação são utilizados iniciadores internos ao produto da primeira reação (Bonants, et al., 1997; Flowers et al., 2006). A Nested-PCR também tem sido usada para a detecção de fitobactérias (Moltmann & Zimmermann, 2005; Poussier & Luisetti

2005). Em sementes genéticas de mandioca pode-se detectar 1-2 células viáveis de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* por reação (Ojeda et al., 2000). Segundo Martin et al., (2000), a Nested-PCR apresenta alta sensibilidade podendo reduzir a incidência dos falsos negativos mas, ao mesmo tempo, a contaminação é sempre uma grande preocupação.

Com o objetivo de estudar e comparar vários isolados de Xcv, Trindade et al., (2005) e Marques (2007) caracterizaram estirpes de Xcv coletadas em diferentes anos, áreas e variedades de videira com base em “fingerprints” gerados por rep-PCR. Os perfis genômicos apresentaram bandas comuns entre os isolados, com potencial para uso em diagnóstico. Contudo, não foi possível correlacionar, através dos estudos das sequências repetitivas, a origem geográfica, a época de coleta ou a cultivar de origem dos isolados com os perfis genômicos.

Posteriormente, com a finalidade de desenvolver métodos de diagnóstico mais eficazes e rápidos para o cancro bacteriano, Trindade et al., (2007) realizaram a amplificação de fragmento de 840 pb do gene *hrpB* do DNA genômico de Xcv com os iniciadores RST2 e RST3 (Leite et al., 1994) e posterior sequenciamento. Três iniciadores (Xcv1F, Xcv2R e Xcv3R) foram desenhados e testados em cinco combinações com os iniciadores externos RST2 e RST3. As combinações RST2/Xcv3R (produto amplificado de 340 pb) e Xcv1F/Xcv3R (240 pb) foram selecionadas por não gerarem bandas secundárias, apresentarem boa reprodutibilidade e amplificação positiva com todos os isolados testados de Xcv. Estes iniciadores foram testados quanto à especificidade e sensibilidade para detecção de Xcv. Com os dois pares de iniciadores a amplificação foi positiva com o DNA de 44 isolados de Xcv, mas também com quatro isolados de *Xanthomas campestris* pv. *mangiferaeindicae* e cinco de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. Entretanto, a digestão dos produtos de PCR com a enzima *Hae* III permitiu diferenciar Xcv dos isolados desses patógenos. Nenhum dos dois pares

de iniciadores amplificou o DNA de videira, nem de 20 bactérias não patogênicas isoladas da flora da videira, ou de 10 isolados de outros seis gêneros de bactérias fitopatogênicas. A sensibilidade dos iniciadores Xcv1F/Xcv3R e RST2/Xcv3R foi de 10 pg e 1 pg de DNA purificado de Xcv, respectivamente. O limite de detecção de RST2/Xcv3R foi de 10^4 ufc/ml, mas empregando-se uma segunda rodada de amplificação com o iniciador interno Xcv1F, esse limite foi de 10^2 ufc/ml.

Em ensaios de detecção de Xcv em pecíolos de videira inoculados, não foi possível detectar a bactéria diretamente por PCR a partir do extrato macerado do tecido sintomático. A detecção do patógeno só foi possível usando-se lavado de placas cultivadas por 72 h ou a partir de uma suspensão de células, preparada a partir de uma colônia em 200 µl de água (Trindade et al., 2007).

Durante a validação dos métodos de Nested-PCR e BIO-PCR aliado ao meio 523 (Kado & Heskett, 1970) para detecção de Xcv em plantas sintomáticas e assintomáticas coletadas em Petrolina-PE (Trindade, 2007), observou-se que algumas amostras com sintomas típicos do cancro bacteriano não foram positivas por PCR, indicando a ocorrência de falsos negativos. Atribuiu-se isso a alguns fatores como a presença de populações bacterianas contaminantes que poderiam influenciar negativamente o crescimento de Xcv, e a distribuição irregular da bactéria nos tecidos infectados. Nas amostras sem sintomas a detecção só foi possível com o emprego da BIO-PCR, seguida de dois ciclos de amplificação (Nested-PCR).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi otimizar a técnica de PCR para detecção de Xcv em tecidos assintomáticos de videira, empregando-se o meio semi-seletivo NYDAM (Peixoto et al., 2006) para a BIO-PCR e Nested-PCR, a fim de tornar o método mais sensível e rápido e uma ferramenta para prevenir a disseminação do patógeno para áreas livre da doença.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Meios de cultura, cultivo e preservação dos isolados

Para realização dos ensaios, foram utilizados os isolados UnB 1183 (coletado em 1998, em Petrolina-PE de folhas da cv. Red Globe) e A-2 (coletado em 2010 de ramos da cv. Red Globe, no Projeto Bebedouro em Petrolina, PE). A identificação dos isolados A-2 e UnB 1183 foi anteriormente confirmada por PCR com os iniciadores específicos Xcv1F/Xcv3R (Trindade et al., 2007). Os isolados foram preservados em água Milli-Q estéril e mantidos a temperatura ambiente.

Para a recuperação, repicagens de rotina e produção de inóculo foram empregados o meio 523 (Kado & Heskett, 1970) ou o meio semi-seletivo NYDAM (Peixoto et al., 2006), onde a bactéria foi cultivada por 48-72 horas a 28-29 °C.

2.2. Extração de DNA

O DNA dos isolados de Xcv foi extraído a partir de culturas de 48 horas em meio 523, utilizando-se o Kit Wizard[®] (Promega) segundo as instruções do fabricante. A quantificação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 1% preparado em tampão TBE 0,5 X (5,4 g de Trisbase, 2,75 g de ácido bórico e 0,375 g de EDTA para 1000 ml). Amostras de DNA genômico (5 µl) foram misturadas a 1 µl do tampão de carregamento 10 X (50 % de glicerol, 1 mM EDTA; 0,4 % azul de bromofenol e 0,4 % de xylene cyanol). As condições de corrida foram a 90 V durante 1 hora em TBE 0,5X. O gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml) por 15 minutos e descorado em água destilada por 10 minutos, para posterior fotodocumentação (L-PIX ST - Locus Biotecnologia). A estimativa da concentração de DNA foi realizada por comparação visual com o marcador High Mass DNA Ladder (Promega[®]). Em seguida,

foram feitas diluições do DNA em água Milli-Q para 10 ng/μL. Todas as amostras de DNA foram mantidas a – 20 °C.

2.3. PCR específica: BIO-PCR e Nested-PCR

Condições da PCR e eletroforese em gel de agarose

As reações foram realizadas utilizando-se 100 μM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl₂, 0.5 μM de cada iniciador - RST2 (5'AGGCCCTGGAAGGTGCCCTGG3') (Leite Jr. et al., 1994), Xcv3R (5'TATGGCAAGGTGGTTCGAACT3') ou Xcv1F (5'TGCAGGTGAGCTGTGC3') (Trindade et al., 2007), 1X tampão da *Taq* (20 mM Tris HCl pH 8.4; 50 mM KCl) e 1U de *Taq* polimerase, 2 μl de DNA, lavados ou suspensão de células, para um volume final de 12 μl.

A BIO-PCR foi conduzida em um único ciclo com os iniciadores Xcv1F/Xcv3R e a Nested-PCR em dois, onde o primeiro “round” ou ciclo foi feito com os iniciadores RST2/Xcv3R (produto amplificado de 340 pb), em seguida os produtos de PCR são diluídos em água estéril (1:50) e usados como molde para um segundo ciclo com Xcv1F/Xcv3R (produto amplificado de 240 pb).

A amplificação do DNA ocorreu através de PCR nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 2 min; 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 64 °C por 1 min e 72 °C por 2 min e extensão final de 10 min a 72 °C, realizados em termociclador PT-100 (M J Research. Inc.).

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% preparado em tampão TBE 0,5 X. Todo o volume da reação foi adicionado a 1 μl do tampão de carregamento 10 X (50 % de glicerol, 1 mM EDTA; 0,4 % azul de bromofenol e 0,4 % de xylene cyanol) e aplicado no gel. As condições de corrida foram a 90 V durante 1 hora em TBE 0,5X. O gel foi corado em solução de brometo de etídio

(0,5 µg/ml) por 15 minutos e descorado em água destilada por 10 minutos, para posterior fotodocumentação (L-PIX ST - Loccus Biotecnologia).

2.4. Determinação do limite mínimo de detecção de *X. campestris* pv. *viticola* por BIO-PCR e Nested-PCR em cachos inoculados artificialmente

Foram realizados cinco ensaios para determinar o limite de detecção de Xcv por BIO-PCR e Nested-PCR. Nos primeiros quatro ensaios, usou-se água destilada estéril para preparo das suspensões bacterianas e lavagem dos frutos; no quinto experimento usou-se solução de sulfato de magnésio a 10 mM contendo 0,3% de Tween 20 para os dois procedimentos.

Em todos os ensaios cachos de videira das variedades Rubi e Crimson aparentemente sadios foram adquiridos no comércio local, separados em amostras de 100 a 120 g e dispostos em bandejas de isopor. Foi realizada uma lavagem dos frutos em água corrente, com posterior desinfestação superficial por imersão em etanol 70% durante 10 a 15 minutos, seguida de três a cinco lavagens em água destilada.

A suspensão bacteriana (isolado A-2 de Xcv) foi ajustada usando-se a Escala 7 de McFarland para obtenção de uma suspensão em torno de 10^9 ufc/ml, seguida de diluições em série de 10x até 10^2 ufc/ml.

Em seguida, os frutos foram pulverizados com aproximadamente 15 ml de suspensão com concentrações de 10^2 a 10^8 ufc/ml, sendo o controle negativo pulverizado com água estéril. Duas a três repetições foram incluídas por tratamento. Os frutos foram mantidos a temperatura ambiente por 24 h para secagem.

Das suspensões de 10^2 a 10^8 ufc/ml foram retiradas alíquotas de 1 ml e armazenadas em tubos Eppendorf de 1,5 ml a 4-6 °C. Dessas alíquotas foram retirados 2 µl para a amplificação e uso como controles positivos da BIO-PCR e Nested-PCR.

Após 24 horas, os cachos foram lavados em 100 ml de água destilada estéril nos quatro primeiros experimentos e no quinto foram lavados em solução de sulfato de magnésio a 10 mM contendo 0,3% de Tween 20. Todos em frascos tipo Erlenmeyer de 250 ml, em agitador horizontal a 200 rpm por 1 hora e 30 minutos.

Para a BIO-PCR, foram retirados 100 µl do lavado dos frutos e distribuídos em meio NYDAM (2-3 placas por amostra), com auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 29 °C por 72 horas. Após esse período todo crescimento microbiano das placas foi lavado com 1-2 ml de água destilada estéril e armazenado em microtubos Eppendorf de 1,5 ml. Em seguida, foram diluídos com água destilada estéril na proporção de 1:10 nos três primeiros ensaios e de 1:100 do terceiro ao quinto experimento. Dessa diluição foram retirados 2 µl para realização da PCR, conforme descrito no item 2.3.

Para a Nested-PCR, foram retiradas 2-3 alíquotas de 1 ml do lavado de cada amostra dos frutos, que foram centrifugadas a 13.200 rpm por 15 min. Recuperou-se o sedimento em 50 µl de água estéril. Em seguida, 2 µl de cada amostra foram utilizados para realização da Nested-PCR, conforme descrito no item 2.3.

Em todos os experimentos foram incluídos como controles positivos: uma suspensão de células da cultura pura da estirpe (A-2) utilizada para a pulverização nos frutos e o DNA purificado da bactéria. Como controle negativo da PCR usou-se reações sem DNA, apenas com adição de água. Os procedimentos para análise por eletroforese em gel de agarose foram realizados conforme já descrito anteriormente (item 2.3).

2.5. Determinação do limite mínimo de detecção de *X. campestris* pv. *viticola* por BIO-PCR e Nested-PCR em folhas inoculadas artificialmente

O mesmo procedimento realizado com cachos de videira foi adotado para se determinar o limite mínimo de detecção em folhas. No primeiro ensaio a suspensão bacteriana foi preparada e diluída em água destilada estéril e do segundo ao quinto em solução de sulfato de magnésio a 10 mM contendo 0,3% de Tween 20, com concentrações finais de 10^2 a 10^8 ufc/ml.

Folhas de videira de mudas da cultivar Thompson Seedless e porta-enxerto IAC 572 de cerca de um ano de idade, mantidas em casa de vegetação, foram coletadas, pesadas em amostras de 1,0-1,5 g, lavadas em água corrente e secas com lenço de papel. A inoculação foi realizada conforme descrito no item anterior (2.4).

As folhas foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 2,0 x 0,5 cm. No primeiro experimento os fragmentos foram colocadas em 70 ml de água destilada estéril, do segundo ao quarto ensaio em 50 ml da solução de sulfato de magnésio a 10 mM contendo 0,3% de Tween 20 e no quinto em 15 ml da mesma solução. Todos em frascos tipo Erlenmeyer de 125 ml, sob agitação a 200 rpm por 1 hora e 30 minutos.

Para cada concentração foram feitas 2-3 repetições. A partir dos lavados das folhas, os dois métodos para detecção (BIO-PCR, com meio NYDAM e Nested-PCR) foram realizados conforme já descrito para os experimentos com cachos.

2.6. Detecção de *X. campestris* pv. *viticola* por BIO-PCR e Nested-PCR em mudas de videira inoculadas artificialmente

Folhas da cultivar Thompson Seedless obtidas de mudas de cerca de um ano de idade, mantidas em casa de vegetação, foram inoculadas com suspensão bacteriana na

concentração de 10^8 ufc/ml do isolado A-2 de Xcv por meio de três técnicas. Na primeira foram realizados dois cortes em cada lado da folha de videira com tesoura imersa na suspensão bacteriana; a segunda foi por meio de fricção com gaze (Peixoto et al., 2007), onde uma compressa de gaze foi umedecida em suspensão bacteriana e levemente friccionada em ambas as superfícies da folha. A terceira técnica foi a de pulverização da suspensão bacteriana nas superfícies abaxial e adaxial das folhas. Como controles, folhas foram inoculadas com água destilada estéril. As plantas foram mantidas em câmara úmida por 48 h. O aparecimento de sintomas nas folhas foi avaliado diariamente até o 25º dia. A coleta das amostras inoculadas para a detecção por PCR (conforme já descrito anteriormente no item 2.3) foi realizada no 25º dia.

2.7. Desenvolvimento de controle interno para falsos negativos

Experimentos foram realizados testando-se ampliações simultâneas com os iniciadores universais para bactérias F984 (5' AACGCGAAGAACCTTAC3') e R1492 (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT3') que geram um produto amplificado de 545 pb do gene do rRNA de 16S (Heuer et al., 1997) e os iniciadores específicos para Xcv Xcv1F/Xcv3R.

Para testar a viabilidade de amplificação com os dois pares de iniciadores (F984/R1492 e Xcv1F/Xcv3R) nas mesmas condições já utilizadas para detecção de Xcv, foi realizada a PCR com o DNA purificado dos isolados A-2 e UnB 1183. Em seguida, a PCR multiplex foi realizada com amostras de folhas inoculadas com Xcv em diferentes concentrações (item 2.5, experimento 5) e com amostras positivas e negativas obtidas nas áreas de produção de videira em Petrolina, testadas anteriormente por BIO-PCR e Nested-PCR

As reações foram realizadas com 100 μ M de cada dNTP, 1.5 Mm de $MgCl_2$, 0.5 μ M de cada iniciador - F984/R1492 e Xcv1F/Xcv3R, 1X tampão da *Taq* (20 mM Tris HCl pH 8.4; 50 mM KCL) e 1U de *Taq* polimerase, 2 μ l de DNA, lavado ou suspensão de células para um volume final de 12 μ l.

2.8. Validação da BIO-PCR e Nested-PCR para detecção de Xcv em viveiros e áreas de produção

Em janeiro de 2012, foram escolhidos aleatoriamente dois viveiros, sendo um localizado em Petrolina-PE e outro em Curaçá-BA, para a validação dos métodos de detecção. Da mesma forma, foram selecionadas três propriedades com cultivo de videira: uma área de produção em Curaçá-BA e duas situadas na área do Projeto de Irrigação Bebedouro, todas localizadas no Vale do Submédio São Francisco.

Nos viveiros, as amostras foram coletadas em zigue-zague dentro dos canteiros. Em cada viveiro foram coletadas 30 amostras assintomáticas. No primeiro coletou-se cinco amostras de cada uma das seis variedades (Thompson, Sugaone, Crimson, Brasil, Itália e Benitaka) e do segundo foram coletadas cinco amostras do porta-enxerto IAC 313, cinco do porta-enxerto IAC 572, cinco da variedade Harmony e 15 da variedade Itália. Cada amostra foi constituída de três folhas que foram destacadas do ápice, do meio e da base de uma mesma planta.

Das áreas de produção foram escolhidas plantas da cultivar Red Globe de forma aleatória. De cada planta foram coletadas amostras de folhas e ramos, com e sem sintomas. Na região de Curaçá-BA (área de produção 1) foram coletadas 10 amostras com sintomas e 10 sem sintomas; na da área de produção 2 (Projeto de Irrigação Bebedouro) foram coletadas 15 com sintomas e 15 sem sintomas; e da área de produção

3, foram obtidas oito com sintomas e 12 sem sintomas. Em resumo, dos viveiros foram coletadas 60 amostras e das áreas de produção 70, totalizando 130 amostras. Após a coleta, as amostras foram identificadas, armazenadas em sacos plásticos, e mantidas em câmara fria até o processamento. Cada amostra foi analisada em duplicatas, tanto para a BIO-PCR quanto para a Nested-PCR, conforme os protocolos descritos anteriormente.

Das 33 amostras com sintomas originárias das áreas de Red Globe foram realizados isolamentos em meio NYDAM. As culturas foram purificadas e submetidas a PCR com os iniciadores Xcv1F/Xcv3R, para confirmação da identidade das bactérias.

RESULTADOS

Determinação do limite mínimo de detecção de *X. campestris* pv. *viticola* por BIO-PCR e Nested-PCR em cachos de videira inoculados artificialmente

BIO-PCR

Considerando os três primeiros experimentos de detecção por BIO-PCR com os iniciadores Xcv1F/Xcv3R (Tabela 1) houve amplificação de 95,2% das amostras de frutos inoculados a 10^8 ufc/ml e com as diluições dos lavados de 1:10. No entanto, somente 7,4% das amostras a 10^3 ufc/ml foram positivas nas mesmas condições anteriormente citadas.

Já nos ensaios 3 a 5 (Tabela 1) utilizando diluições 1:100 dos lavados, a amplificação foi positiva em 77,7% das amostras a 10^8 ufc/ml. Também utilizando diluições de 1:100 Xcv foi detectada em 75% das amostras inoculadas a 10^7 , 10^6 e 10^5 ufc/ml. Nas amostras inoculadas a 10^4 ufc/ml a detecção da bactéria foi positiva em

37,5% dos casos, em 29,41% dos inoculados a 10^3 ufc/ml e 25% dos inoculados a 10^2 ufc/ml.

A bactéria Xcv pôde ser detectada de forma consistente através de BIO-PCR a partir de uma concentração de 10^5 ufc/ml usando a solução de sulfato de magnésio a 10 mM contendo 0,3% de Tween 20 (Figura 1). Contudo, os experimentos mostraram que populações mais baixas podem ser detectadas, embora não em 100% das repetições. O limite mínimo de detecção de Xcv observado no experimento cinco foi de 10^2 ufc/ml, no qual se obteve melhores resultados utilizando a solução de sulfato de magnésio a 10 mM contendo 0,3% de Tween 20 (Tabela 1).

Nested-PCR

Em todos os cinco experimentos realizados (Tabela 2) a amplificação de Xcv foi positiva por meio da Nested-PCR em 45,7% das amostras inoculadas na concentração 10^3 ufc/ml. A detecção a 10^2 ufc/ml, foi positiva em 50% das repetições no ensaio 5, onde foi introduzida uma modificação no método. Considerando todos os experimentos a bactéria foi detectada em 95,65% das amostras a 10^8 ufc/ml, em 100% a 10^7 ufc/ml, 75% a 10^6 ufc/ml, 37,5% a 10^5 ufc/ml, 50% a 10^4 ufc/ml, 45,7% a 10^3 ufc/ml e 25% a 10^2 ufc/ml. Devido a alta sensibilidade do método contaminações foram observadas nas amostras de controle negativo do ensaio 5. Considerando o experimento cinco o limite mínimo de detecção por Nested-PCR foi de 10^2 ufc/ml.

Determinação do limite mínimo de detecção de *X. campestris* pv. *viticola* por BIO-PCR e Nested-PCR em folhas inoculadas artificialmente

BIO-PCR

No ensaio 1 (Tabela 3) em que a lavagem das folhas foi feita em água destilada apenas 11% amostras foram positivas quando inoculadas em concentração baixa (10^3 ufc/ml) e 100% das amostras inoculadas com alta concentração (10^8 ufc/ml). Considerando os experimentos 2 a 4 em que as folhas foram lavadas em 50 ml da solução de sulfato de magnésio a 10 mM, contendo 0,3% de Tween 20, a detecção só foi consistente entre os experimentos na concentração mais alta (10^8 ufc/ml). Optou-se então, pela redução do volume de solução para lavagem das amostras para 15 ml. Com essa modificação (experimento 5), a detecção ocorreu a partir de 10^5 ufc/ml em 100% das repetições e o limite mínimo de detecção foi de 10^2 ufc/ml.

Nested-PCR

A detecção por Nested-PCR de Xcv em folhas inoculadas com suspensões de 10^2 a 10^8 ufc/ml (Tabela 4), foi positiva em todos os experimentos apenas para as amostras inoculadas a partir de 10^5 ufc/ml. Embora de forma não reproduzível entre os diferentes ensaios, a detecção por Nested-PCR foi observada nas concentrações mais baixas (10^2 a 10^4 ufc/ml). Considerado o ensaio 5 o limite mínimo de detecção foi de 10^3 ufc/ml. Nos ensaios com folhas nenhuma contaminação foi observada.

Detecção de *X. campestris* pv. *viticola* por BIO-PCR e Nested-PCR em mudas de videira inoculadas artificialmente

Com os três métodos de inoculação testados foram observados sintomas a partir do 10º dia após a inoculação. Aos 25 dias foi possível detectar pelo método de lavagem de fragmentos das folhas seguido de BIO-PCR e Nested-PCR (conforme descrito no item 2.5, experimentos 2-4) a presença de Xcv nas folhas inoculadas. O método que resultou em maiores níveis de detecção foi o método de fricção com gaze, tanto na BIO-PCR quanto na Nested-PCR (Tabela 5).

Mesmo nas áreas foliares sem lesão aparente, foi possível detectar Xcv quando as folhas foram inoculadas pelo método de gaze ou pulverização.

Validação da BIO-PCR e Nested-PCR para detecção de Xcv em viveiros e áreas de produção de videira

Das 60 amostras coletadas em dois viveiros, foi possível detectar a presença de Xcv por BIO-PCR em três amostras coletadas no viveiro 1 (Tabela 6; Figura 2), correspondendo a mudas da cv. Sugraone, Itália e Benitaka. Contudo, nenhuma dessas três amostras assintomáticas (viveiro 1), foi positiva por Nested-PCR.

Nas áreas de produção a BIO-PCR, foi em geral, mais eficiente na detecção de Xcv (Figura 3). Em relação às amostras de Red Globe com sintomas, a detecção foi positiva por BIO-PCR em 97% das amostras contra 69,7% por Nested-PCR. Das amostras sem sintomas cerca de 30% foram positivas por BIO-PCR, mas nenhuma amostra foi positiva por Nested-PCR (Tabela 7).

Do total de 33 plantas em que foram coletadas amostras com sintomas e sem sintomas, em 11 dessas foi possível detectar Xcv por BIO-PCR, tanto nas amostras foliares com sintomas quanto nas sem sintomas.

Das 33 amostras com sintomas, obtiveram-se culturas puras típicas de Xcv em 28. Em cinco delas observou-se contaminantes nas placas e não foi possível isolar Xcv. Dessas, 27 tiveram sua identidade confirmada por PCR. Uma única amostra com sintoma foi negativa tanto para BIO-PCR quanto para Nested-PCR, além de também não ter sido possível isolar Xcv (amostra 115 da área de produção 3, RG/CS/5, anexo).

PCR com controle interno para falsos negativos

Com o objetivo de inserir nas reações de PCR um controle interno para falsos negativos, inicialmente os iniciadores Xcv1F/Xcv3R e F984/R1492 foram testados simultaneamente em reações contendo DNA dos isolados A-2 ou UnB 1183. Observou-se amplificação dos dois fragmentos (545 e 240 pb) (Figura 4), indicando a possibilidade do uso dos iniciadores no formato multiplex.

Em seguida, testou-se a PCR multiplex com os lavados de folhas inoculadas em diferentes concentrações (conforme metodologia item 2.5, experimento 5). Observou-se amplificação dos dois fragmentos em todas as concentrações (10^2 a 10^8 ufc/ml) exceto no controle inoculado com água (Figura 5).

Dentre as amostras de videira coletadas nas áreas de produção, selecionou-se amostras negativas e uma positiva por BIO-PCR ou Nested-PCR para testes com controle interno. As amostras positivas (BIO-PCR ou Nested-PCR) originaram dois fragmentos, no entanto apenas uma amostra entre as negativas, gerou o fragmento de 545 pb (Figura 6), conforme esperado.

Para verificar se os iniciadores para a região do 16S rRNA estariam amplificando o DNA de outras bactérias presentes nas amostras, foram preparadas reações com as mesmas amostras e apenas o par de iniciadores F984/R1492. Amplificação foi positiva nas amostras com sintomas, e para os lavados de oito amostras sem sintomas (Figura 7), anteriormente negativas por BIO-PCR ou Nested-PCR.

DISCUSSÃO

Neste estudo, os resultados mostraram que é possível detectar Xcv em plantas assintomáticas de videira por BIO-PCR aliado ao meio semi-seletivo NYDAM. Em ensaios realizados por Trindade (2007) utilizando o meio 523 para o enriquecimento microbiano antes da PCR, a detecção em material assintomático só foi possível quando se associava à BIO-PCR, dois ciclos de PCR (BIO-Nested-PCR). No meio semi-seletivo NYDAM há inibição de bactérias saprófitas e fitopatogênicas (Peixoto et al., 2006), o que pode contribuir para maior eficiência na detecção com apenas um ciclo com os iniciadores Xcv1F/Xcv3R.

Ensaio foram realizados para determinar o limite mínimo de detecção de Xcv por BIO-PCR e Nested-PCR em frutos e folhas de videira. Este limite é definido como a quantidade mínima de DNA alvo que pode ser detectado em uma amostra com um determinado intervalo de confiança (Teló et al., 2007). Nestes experimentos várias modificações no método foram testadas, ao longo dos ensaios, 1 a 5: tempo de enriquecimento, diluição do lavado para a BIO-PCR, volume e composição da solução para lavagem dos frutos ou fragmentos de folhas. Os melhores resultados foram obtidos quando se adicionou MgSO₄ e Tween tanto no preparo de suspensões quanto na lavagem das amostras. A partir desses resultados foi possível observar que a BIO-PCR

foi o método pelo qual se obteve o melhor limite de detecção tanto em frutos quanto em folhas (10^2 ufc/ml). Já por Nested-PCR, em frutos o limite foi de 10^2 ufc/ml e em folhas foi de 10^3 ufc/ml. Tais limites são comparáveis aos limites relatados para outras bactérias fitopatogênicas. Para a detecção de *Erwinia psidii* em extratos de folhas de goiabeira misturados com suspensão bacteriana o limite foi de 10 ufc/ml por BIO-PCR (Silva, 2011). Em um estudo para detecção de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em citrus, por Nested-PCR o nível de detecção foi de 10^2 ufc/ml (Kositcharoenkul et al., 2011). Robène-Soustrade et al., (2006) conseguiram detectar *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* por Nested-PCR obtido com culturas puras e extratos de plantas de *Anthurium* em um nível de 10^3 ufc/ml, o que permitiu a detecção do patógeno a partir de plantas contaminadas 12 dias antes do aparecimento dos sintomas.

No presente estudo foram necessários, no mínimo, quatro dias para obtenção dos resultados por BIO-PCR, pois foi necessário um tempo de enriquecimento da população bacteriana de 72 h, que foi mais eficiente na detecção de Xcv quando em baixas concentrações comparado ao tempo inicialmente testado de 48 h. Como consequência do aumento do tempo de enriquecimento, houve o aumento de colônias microbianas que resultou na necessidade de diluir os lavados em 1:100, para evitar inibição da PCR por uma alta concentração de células lisadas na reação. Por outro lado, a Nested-PCR pode ser realizada em 2-3 dias, entretanto, as duas rodadas de amplificação em diferentes tubos também pode aumentar o risco de contaminação (Olmos et al., 1999; Llop et al., 2000), que é um fator de desvantagem para este método, já que esta contaminação pode gerar falsos positivos, conforme observado em um dos experimentos (Tabela 2, experimento 5).

Para a Nested-PCR a redução do volume de 70 ml para 15 ml da solução para lavagem dos fragmentos de folhas, teve efeito negativo, possivelmente devido a inibidores presentes nos tecidos da videira. Esse problema também foi relatado por

Trindade (2007) ao testar a PCR diretamente com extratos de macerados de videira. Já para a BIO-PCR, a redução do volume teve efeito positivo, pois com o lavado menos diluído houve uma maior concentração de *Xcv* crescendo em meio NYDAM, facilitando a detecção. Os problemas com a presença de inibidores são evitados com a BIO-PCR uma vez que esses são removidos ou difundidos no meio (Schaad et al., 1995; Fatmi et al., 2005).

Em mudas inoculadas artificialmente com *Xcv* em casa de vegetação, detectou-se a bactéria por BIO-PCR e Nested-PCR, independente do método de inoculação. No entanto, os maiores níveis de detecção ocorreram quando as folhas foram inoculadas pelo método da fricção com gaze, que possivelmente distribuiu melhor a bactéria na superfície foliar. Mesmo nas áreas sem lesão aparente foi possível detectar *Xcv* por PCR, indicando a capacidade dos métodos em detectar *Xcv* antes do aparecimento dos sintomas.

Nos ensaios de validação dos métodos, a BIO-PCR foi o método que apresentou maior eficiência na detecção de *Xcv* em amostras com e sem sintomas do cancro bacteriano da videira, incluindo as amostras dos viveiros. Nas amostras sem sintomas e de mudas dos viveiros que foram negativas por BIO-PCR, é possível que nessas plantas, a concentração da bactéria estivesse abaixo do limite detectável pelo método ou que a bactéria não estava presente na amostra, conseqüentemente a muda/planta estava livre de *Xcv*.

A técnica de BIO-PCR também foi utilizada por Sakthivel et al., (2001) para a detecção de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* em sementes de arroz naturalmente infectadas provenientes de plantas assintomáticas. O método permitiu o monitoramento do patógeno em lotes de sementes e pode ser aplicada com a mesma eficiência sem a necessidade de extração de DNA.

Além de detectar Xcv por BIO-PCR em quase todas as amostras com sintomas coletadas nas áreas de produção de Red Globe, considerada uma das cultivares mais suscetíveis, também foi possível realizar o isolamento e confirmar a identidade dos isolados por PCR da maioria dessas amostras. Estes resultados apenas confirmam a maior eficiência e rapidez da detecção de Xcv por BIO-PCR em plantas sintomáticas em relação ao método tradicional de observação dos sintomas e isolamentos. Para plantas assintomáticas, não teria sido possível utilizar o método convencional de isolamento e identificação da cultura pura. Também foi possível detectar Xcv por BIO-PCR em amostras com e sem sintomas de uma mesma planta. Isto sugere ser possível detectar a movimentação da bactéria na planta para áreas ainda sem sintomas.

Já com a Nested-PCR foi possível detectar Xcv em apenas algumas amostras com sintomas e nenhuma das amostras sem sintomas. Nas amostras sem sintomas dos viveiros, todas foram negativas por Nested-PCR.

No caso da única amostra da cv. Red Globe com sintoma, que foi negativa por BIO-PCR e por Nested-PCR, acredita-se que os sintomas possam ter sido de outra doença como míldio, oídio ou antracnose; ou causado por fatores abióticos, como toxicidade química de algum produto aplicado ou desequilíbrio nutricional, uma vez que não se conseguiu isolar Xcv (amostra 115 da área de produção 3, RG/CS/5, Anexo).

O uso de controle interno na PCR tem como finalidade assegurar a confiabilidade dos resultados, eliminando a possibilidade de falsos negativos. Com esta intenção, testes foram realizados incluindo-se um par de iniciadores universais para bactérias nas reações com os iniciadores para Xcv. Os resultados mostraram que das amostras testadas com DNA purificado de Xcv e amostras positivas por BIO-PCR e Nested-PCR houve amplificação dos dois fragmentos. Em amostras negativas por BIO-PCR e Nested-PCR e contendo possivelmente outras bactérias a amplificação foi positiva em algumas amostras. Esses resultados negativos poderiam ser explicados pela

baixa concentração de células de outras bactérias, presentes nos lavados, que não foram quantificadas; pela baixa sensibilidade dos iniciadores universais que não foi testada; ou pela temperatura de anelamento usada, que poderia estar acima do ótimo para os iniciadores universais. Ensaios comparando-se diferentes diluições dos lavados com lavados não diluídos poderiam ser feitos para verificar o potencial de detecção de outras bactérias pelo método. Alternativamente, outra estratégia poderia ser desenvolvida que dispensasse o uso da PCR multiplex, usando-se a clonagem do DNA alvo em plasmídeo (Cortez-Herrera et al., 2008).

Com base nos diversos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que é possível detectar Xcv em baixas concentrações por BIO-PCR, em frutos e folhas de videiras assintomáticas com enriquecimento da população bacteriana por 72 horas em NYDAM. Na validação dos métodos em campo (infecções naturais) a BIO-PCR mostrou-se mais eficiente que a Nested-PCR, detectando amostras com e sem sintomas, incluindo 5% das amostras sem sintomas dos viveiros. A detecção de Xcv em mudas assintomáticas de viveiros aponta para a necessidade de maior controle na certificação de mudas, que potencialmente podem disseminar a doença para áreas ainda livres.

A BIO-PCR também pode ser utilizada para detecção da bactéria em qualquer parte da planta, uma vez que foi possível detectá-la em folhas, cachos e bagas e em bacelos sem sintomas. Também pode ser empregado para estudos de translocação de Xcv na planta, uma vez que foi possível detectá-la em folhas com e sem sintomas de uma mesma planta. O método de PCR específico aqui descrito é uma valiosa ferramenta de diagnóstico que pode ser usado para detectar o patógeno em fases iniciais da infecção e para monitorar a doença. Além disso, tal método poderia ser empregado pelas agências de defesa sanitária para a certificação de mudas em viveiros, por clínicas de diagnose de doenças de plantas e estações quarentenárias, contribuindo para a redução da disseminação da bactéria para áreas livres da doença no país.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq/MAPA (Edital CNPq/MAPA/SDA nº 64/2008), pelo financiamento da pesquisa, Embrapa semiárido, ao Professor Helson M. M. do Vale, Valéria Sandra de O. Costa e Edna Santos de Barros pela colaboração e apoio técnico.

Tabela 1. Detecção molecular por BIO-PCR de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em frutos assintomáticos de videira inoculados artificialmente

Concentrações das suspensões inoculadas ufc/ml	Experimentos					
	1	2	3		4	5
	D ^d 1:10	D 1:10	D 1:10	D 1:100	D 1:100	D 1:100
0	0 ^a /4 ^b	0/6	1/4	0/1	0/4	0/4
10 ²	NT ^c	NT	NT	NT	0/4	2/4
10 ³	0/9	0/9	2/9	5/9	0/4	0/4
10 ⁴	NT	NT	NT	NT	2/4	1/4
10 ⁵	NT	NT	NT	NT	2/4	4/4
10 ⁶	NT	NT	NT	NT	2/4	4/4
10 ⁷	NT	NT	NT	NT	2/4	4/4
10 ⁸	8/9	9/9	3/3	1/1	4/4	2/4

^a Número de amostras positivas por PCR; ^b Número de amostras processadas; ^c NT: Não testado; ^d D: Diluição; Nos experimentos 1 a 4 os cachos foram lavados em água destilada estéril e no experimento 5 com solução de sulfato de magnésio a 10 mM contendo 0,3% de Tween 20.

Tabela 2. Detecção molecular por Nested-PCR de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em frutos assintomáticos de videira inoculados artificialmente

Concentrações das suspensões inoculadas ufc/ml	Experimentos				
	1	2	3	4	5
	0	0 ^a /6 ^b	0/6	0/4	0/4
10 ²	NT ^c	NT	NT	0/4	2/4
10 ³	9/9	1/9	4/9	0/4	2/4
10 ⁴	NT	NT	NT	0/4	4/4
10 ⁵	NT	NT	NT	0/4	3/4
10 ⁶	NT	NT	NT	2/4	4/4
10 ⁷	NT	NT	NT	4/4	4/4
10 ⁸	9/9	3/3	2/3	4/4	4/4

^a Número de amostras positivas por PCR; ^b Número de amostras processadas; ^c NT: Não testado; Nos experimentos 1 a 4 os cachos foram lavados em água destilada estéril e no experimento 5, com solução de sulfato de magnésio a 10 mM contendo 0,3% de Tween 20.

Tabela 3. Detecção molecular por BIO-PCR de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em folhas assintomáticas de videira inoculadas artificialmente

Concentrações das suspensões inoculadas ufc/ml	Experimentos				
	1	2	3	4	5
0	0 ^a /9 ^b	0/4	0/4	0/4	0/6
10 ²	NT ^c	0/4	1/4	0/4	3/6
10 ³	1/9	3/4	1/4	0/4	2/6
10 ⁴	NT	2/4	0/4	1/4	5/6
10 ⁵	NT	4/4	0/4	0/4	6/6
10 ⁶	NT	4/4	0/4	0/4	6/6
10 ⁷	NT	2/4	0/4	1/4	6/6
10 ⁸	9/9	2/4	2/4	4/4	6/6

^a Número de amostras positivas por PCR; ^b Número de amostras processadas; ^c NT: Não testado; O experimento 1 as folhas foram lavadas com água destilada estéril, do 2 a 4 foram lavadas em 50 ml da solução de e sulfato de magnésio a 10 mM contendo 0,3% de Tween 20 e o experimento 5 foram lavadas em 15 ml da solução de e sulfato de magnésio a 10 mM contendo 0,3% de Tween 20.

Tabela 4. Detecção molecular por Nested-PCR de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em folhas assintomáticas de videira inoculadas artificialmente

Concentrações das suspensões inoculadas ufc/ml	Experimentos				
	1	2	3	4	5
0	0 ^a /9 ^b	0/4	0/4	0/4	0/6
10 ²	NT ^c	0/4	1/4	0/4	0/6
10 ³	1/9	3/4	0/4	0/4	3/6
10 ⁴	NT	0/4	2/4	3/4	0/6
10 ⁵	NT	2/4	1/4	3/4	1/6
10 ⁶	NT	4/4	4/4	4/4	5/6
10 ⁷	NT	0/4	4/4	4/4	5/6
10 ⁸	9/9	4/4	4/4	4/4	4/6

^a Número de amostras positivas por PCR; ^b Número de amostras processadas; ^c NT: Não testado; No experimento 1 as folhas foram lavadas em água destilada estéril, os experimentos 2 a 4 foram lavadas em 50 ml da solução de e sulfato de magnésio a 10 mM contendo 0,3% de Tween 20, e no experimento 5, foram lavadas em 15 ml da solução de e sulfato de magnésio a 10 mM contendo 0,3% de Tween 20.

Tabela 5. Detecção molecular por PCR de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em mudas de videira cv. Thompson Seedless inoculadas artificialmente

Método de inoculação	BIO-PCR	Nested-PCR
Tesoura imersa em suspensão	1 ^a /6 ^b	3/6
Fricção com gaze	5/6	6/6
Pulverização	1/6	3/6
Controles	0/9	0/9

^a Número de amostras positivas por PCR; ^b Número de amostras processadas; Detecção aos 25 dias após inoculação

Tabela 6. Detecção molecular por PCR de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em folhas de mudas de videiras assintomáticas, coletadas em viveiros na região do Vale do Submédio São Francisco, em janeiro de 2012

Viveiro	BIO-PCR	Nested-PCR
Viveiro 1	3 ^a /30 ^b	0/30
Viveiro 2	0/30	0/30
TOTAL	3/60 (5%)	0/60 (0%)

^a Número de amostras positivas por PCR; ^b Número de amostras processadas

Tabela 7. Detecção molecular por PCR de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em folhas de videiras assintomáticas e sintomáticas, coletadas em áreas de produção na região do Vale do Submédio São Francisco, em janeiro de 2012

Propriedade	BIO-PCR		Nested-PCR	
	SS	CS	SS	CS
Área de produção 1	5 ^a /10 ^b	10/10	0/10	10/10
Área de produção 2	3/15	15/15	0/15	9/15
Área de produção 3	3/12	7/8	0/12	4/8
TOTAL	11/37 (29,7%)	32/33 (97%)	0/37 (0%)	23/33 (69,7%)

^a Número de amostras positivas; ^b Número de amostras processadas; ^d SS: Amostras sem sintoma; ^e CS: Amostras com sintoma

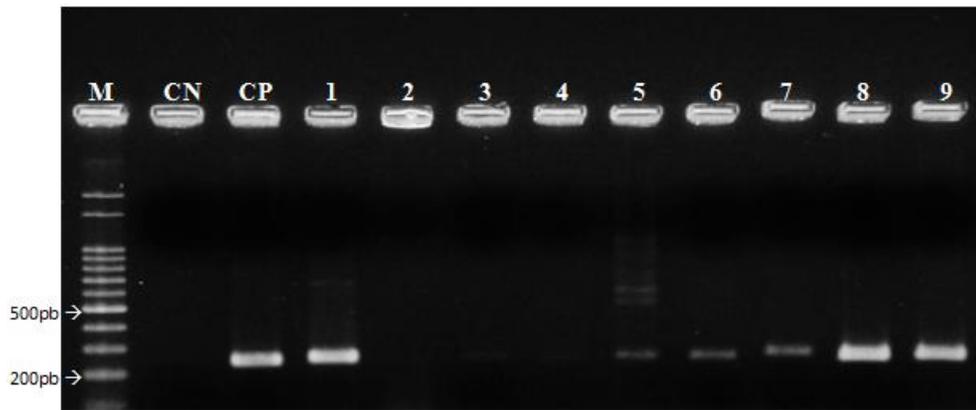


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da BIO-PCR realizada a partir de cachos de videira inoculados com *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* isolado A-2 em diferentes concentrações, de 10^2 a 10^8 ufc/ml, utilizando o par de iniciadores Xcv1F/X v3R. **M** – Marcador 100pb DNA Ladder (Ludwig - Biotec); **CN** – Controle Negativo: reação livre de DNA; **CP** – Controle Positivo: DNA purificado do isolado A-2; **1** – Suspensão a 10^8 ufc/ml, utilizada para pulverização nos frutos; **2** – Amostras inoculadas com água (controle); **3** -10^2 ufc/ml; **4** -10^3 ufc/ml; **5** -10^4 ufc/ml; **6** -10^5 ufc/ml; **7** -10^6 ufc/ml; **8** -10^7 ufc/ml; **9** -10^8 ufc/ml.

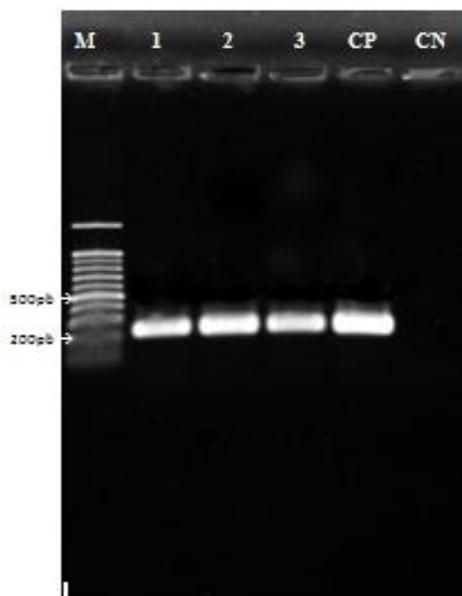


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de BIO-PCR utilizando os iniciadores Xcv1F/Xcv3R. **M** – Marcador 100pb DNA Ladder (Promega®); **CN** – controle negativo: reação livre de DNA; **C**; **CP** – controle positivo de DNA purificado do isolado A-2; **1-3**: Lavado de placas de folhas sem sintomas de mudas de viveiro.

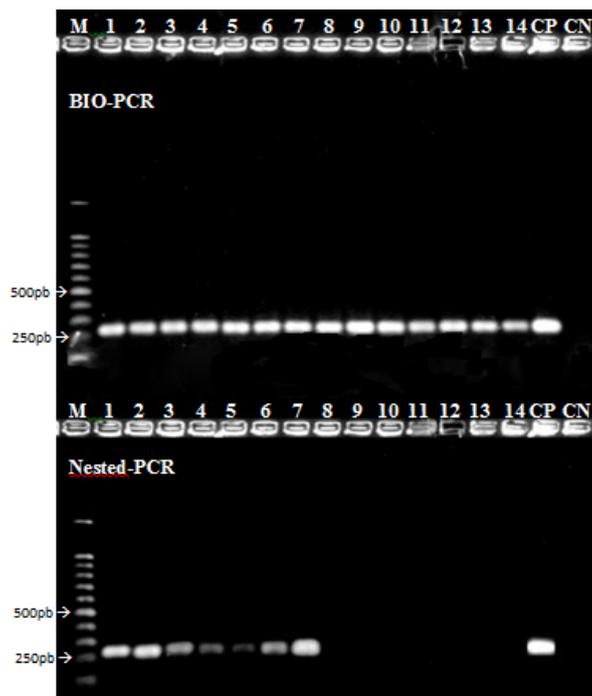


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de BIO-PCR e Nested-PCR utilizando os iniciadores Xcv1F/Xcv3R. **M** – Marcador 100pb DNA Ladder (Promega®); **CN** – controle negativo: reação livre de DNA; **C**; **CP** – controle positivo de DNA purificado do isolado A-2; **1–7**: Lavado de folhas com sintomas de áreas de produção; **8–14**: Lavado de folhas sem sintomas de áreas de produção.

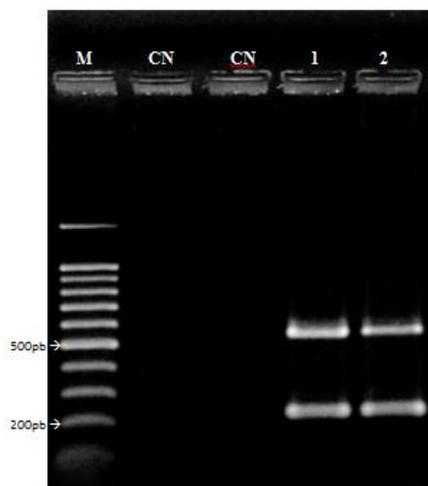


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da PCR com os iniciadores Xcv1F/Xcv3R (240pb) e F984/R1492 (545pb). **M** – Marcador 100pb DNA Ladder (Promega®); **CN** – controle negativo: reação livre de DNA; **1** – DNA purificado do isolado A-2; **2** - DNA purificado do isolado UnB 1183.

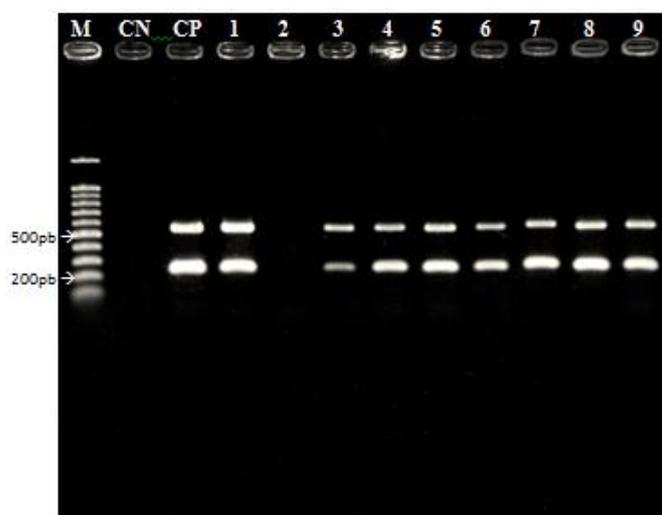


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da BIO-PCR com iniciadores Xcv1F/Xcv3R realizada a partir de folhas de videira inoculadas com *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (isolado A-2) em diferentes concentrações, de 10^2 a 10^8 ufc/ml e F984/R1492 (545pb). **M** – Marcador 100pb DNA Ladder (Promega®); **CN** – controle negativo: reação livre de DNA; **CP** – controle positivo: DNA purificado do isolado A-2; **1** – Suspensão a 10^8 ufc/ml, utilizada para pulverização nos frutos; **2** – Amostras inoculadas com água (controle); **3** – 10^2 ufc/ml; **4** – 10^3 ufc/ml; **5** – 10^4 ufc/ml; **6** – 10^5 ufc/ml; **7** – 10^6 ufc/ml; **8** – 10^7 ufc/ml; **9** – 10^8 ufc/ml.



Figura 6. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de BIO-PCR e Nested-PCR, utilizando os iniciadores Xcv1F/Xcv3R (240pb) e F984/R1492 (545pb). **M** – Marcador 100pb DNA Ladder Promega®); **CN** – controle negativo: reação livre de DNA; **C**; **CP** – controle positivo de DNA purificado do isolado A-2; **1** – Lavado de folhas Red Globe com sintomas; **2-17**: Amostras sem sintomas de Xcv, negativas por BIO-PCR ou Nested-PCR com iniciadores Xcv1F/Xcv3R.

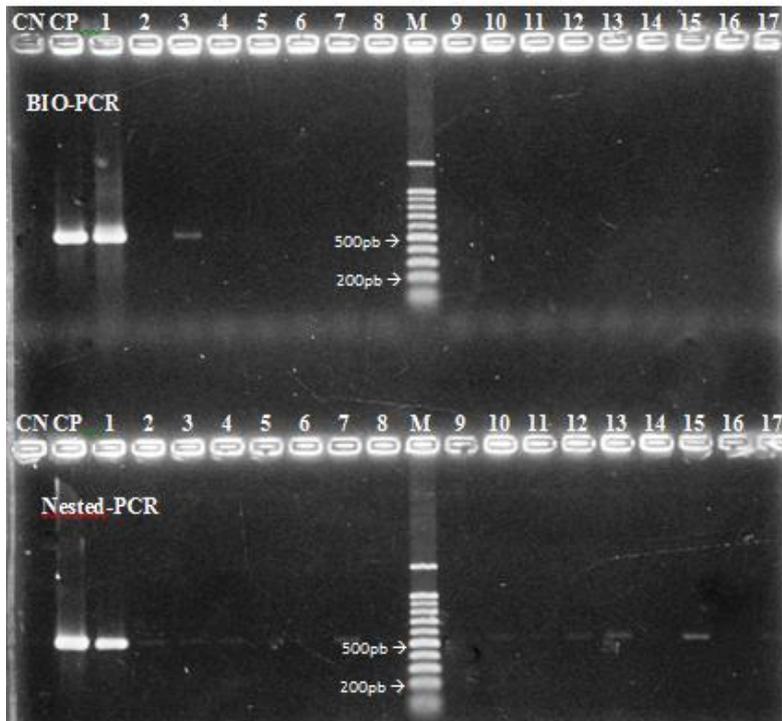


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de BIO-PCR e Nested-PCR, utilizando os iniciadores F984/R1492 (545pb). **M** – Marcador 100pb DNA Ladder (Promega®); **CN** – controle negativo: reação livre de DNA; **CP** – controle positivo de DNA purificado do isolado A-2; **1** – Lavado de folhas de Red Globe com sintomas.; **2-17**: Amostras sem sintomas de Xcv, negativos pro BIO-PCR ou Nested-PCR com iniciadores Xcv1F/Xcv3R.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida IG (2002) O Cancro bacteriano da videira no Brasil. Anais da VII Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico – Frutas. pp. 66-74.

Araújo JSP, Reis Júnior FB, Cruz GB, Oliveira BC, Robbs CF, Ribeiro R LD, P JC (2005) Produção e caracterização de anticorpos policlonais contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. Pesquisa Agropecuária Brasileira 40:305-309.

Bonants P, Hagenaar-de Weerd M, van Gent-Pelzer M, Lacourt I, Cooke D, Duncan J (1997) Detection and identification of *Phytophthora fragariae* Hickman by the polymerase chain reaction. European Journal of Plant Pathology 103:345-355.

Burokiene D (2006) Early detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* in tomato seedlings. Agronomy Research 4:151–154.

Cortez-Herrera CE, Sperhacke RD, Becker D, Kritskii A, Zaha A, Rossetti MLR (2008) Internal control in PCR for *Mycobacterium tuberculosis*: usefulness and improvement of the diagnosis. Brazilian Archives of Biology and Tecnology 51(4):485-491.

Fatmi M, Damsteegt VD, Schaad NW (2005) A combined agar-absorption and BIO-PCR assay for rapid, sensitive detection of *Xylella fastidiosa* in grape and citrus. Plant Pathology 54:1-7.

Flowers JL, Hartman JR, Vaillancourt LJ (2006) Histology of *Diplodia pinea* in diseased and latently infected *Pinus nigra* shoots. Forest Pathology 36:447-459.

Harmon PF, Dunkle LD, Latin R (2003) A rapid PCR-based method for the detection of *Magnaporthe oryzae* from infected perennial ryegrass. *Plant Disease* 87:1072-1076.

Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington EM (1997). Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 3233-3241.

Kado CI, Heskett MG (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60:969-976.

Kositcharoenkul N, Chatchawankanphanich O, Bhunchoth A, Kositratana W (2011) Detection of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* from field samples using single-tube nested PCR. *Plant Pathology* 60:436–442.

Leite Jr. RP, Minsavage GV, Bonas U, Stall RE (1994) Detection and identification of phytopathogenic *Xanthomonas* strains by amplification of DNA sequences related to the *hrp* genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Applied and Environmental Microbiology* 60:1068-1077.

Llop P, Bonaterra A, Peñalver J, López MM (2000). Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Applied Environmental Microbiology* 66, 2071– 2078.

Malavolta Junior VA, Almeida IMG, Sugimori MH, Ribeiro IJA, Rodrigues Neto J, Pires EJP, Nogueira EMC (1999) Ocorrência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videira no Brasil. *Summa Phytopathologica* 25:262-264.

MAPA (2008) - Instrução Normativa Nº 41. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 20 nov 2011.

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

Martin RR, James D, Lévesque CA (2000) Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. *Annual Review of Phytopathology* 38:207–39.

Martin FN, Tooley PW (2004) Identification of *Phytophthora* isolates to species level using restriction fragment length polymorphism analysis of a polymerase chain reaction-amplified region of mitochondrial DNA. *Phytopathology* 94:983-991.

McCartney HA, Foster SJ, Fraaije BA, Ward E (2003) Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Management Science* 59:129-142.

Moltmann E, Zimmermann C (2005) Detection of *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry plants by nested-PCR. *Bulletin OEPP/EPPO* 35:53-54.

Moura L, Darrasse A, Jacques MA, Duclos J (2005) Desenvolvimento e validação do Bio-PCR na detecção de *P. corrugata*, *P. mediterranea* e *P. viridiflava* em raízes e caules de tomateiro. Actas Portuguesas de Horticultura 7. V Congresso Ibérico de Ciências Hortícolas. IV Congresso Iberoamericano de Ciências Hortícolas 3:144-150.

Olmos A, Cambra M, Esteban O, Gorris M.T, Terrada E (1999) New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed tube. Nucleic Acids Research 27, 1564– 1565.

Ojeda S, Verdier V (2000) Detecting *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in cassava true seeds by nested polimerase chain reaction assay. Canadian Journal of Plant Pathology 22:241-247.

Peixoto AN (2006) Meio semi-seletivo para isolamento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. Ciência Rural 36(14):1317:1320.

Peixoto AR, Mariano RLR, Moreira JOT, Viana IO (2007) Hospedeiros alternativos de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. Fitopatologia Brasileira 32:161-164.

Peres NA, Harakava R, Carroll GC, Adaskaveg JE, Timmer LW (2007) Comparison of molecular procedures for detection and identification of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae*. Plant Disease 91:525-531.

Poussier S, Luisetti J (2005) Specific detection of biovars of *Ralstonia solanacearum* in plant tissues by Nested-PCR-RFLP. European Journal of Plant Pathology 106:225-265.

Robène-Soustrade I, Laurent P, Gagnevin L, Jouen E, Pruvost O (2006) Specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* in anthurium (*Anthurium andreanum*) tissues by nested-PCR. Applied and Environmental Microbiology. 72:1072-1078.

Sakthivel N, Mortensen N, Mathur SB. (2001) Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in artificially inoculated and naturally infected rice seeds and plants by molecular techniques. Applied Microbiology and Biotechnology 56:435-441.

Schaad NW, Cheong SS, Tamaki S, Hatziloukas E, Panopoulos NJ (1995) A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. Phytopathology 85: 243-248.

Silva (2011) Desenvolvimento e aplicação de um método para detecção molecular de *Erwinia psidii*, agente causal da seca dos ponteiros da goiabeira. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, DF.

Singh D, Dhar S (2011) BIO-PCR based diagnosis of *Xanthomonas campestris* pathovars in black rot infected leaves of crucifers. Indian Phytopathology 64(1):7-11.

Song WY, Kim HM, Hwang CY, Schaad NW (2004) Detection of *Acidovorax avenae* ssp. *avenae* in rice seeds using BIO-PCR. Journal of Phytopathology 152: 667-676.

Teló EP, Machado ABMP, Schmitt VM, Chesky M (2007) Determinação do limite mínimo de detecção da técnica de PCR “semi-nested” para *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*. RBAC 39(3):197-200.

Trindade LC, Lima MF, Ferreira, MASV (2005) Molecular characterization of Brazilian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Fitopatologia Brasileira* 30:46-54.

Trindade LC (2007) Diagnose molecular do cancro bacteriano da videira causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília, DF.

Trindade LC, Marques E, Lopes DB, Ferreira MASV (2007) Development of a molecular method for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Summa Phytopathologica* 33(1):16-23.

Vincelli P, Tisserat N (2008) Nucleic Acid–Based Pathogen Detection in Applied Plant Pathology. *Plant Disease* 92(5):660:669.

Wiglesworth MD, Nesmith WC, Schardl CL, Li DX, Siegel MR (1994) Use of specific repetitive sequences in *Peronospora tabacina* for the early detection of the tobacco blue mold pathogen. *Phytopathology* 84:425-430.

Zhang ZG, Li YQ, Fan H, Wang YC, Zheng XB (2006) Molecular detection of *Phytophthora capsici* in infected plant tissues, soil and water. *Plant Pathology* 55:770-775.

ANEXO

Amostras (folhas e ramos com e sem sintomas) coletadas na região do Vale do Submédio São Francisco, em janeiro de 2012

Nº amostra	Local	Data coleta	Variedade	Sintomas	Isolamento	Data processamento	N-PCR		Bio-PCR		Obs. (id origem)
1.	Viveiro 1	23/01/12	Thompson	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	-/-	
2.	Viveiro 1	23/01/12	Thompson	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	-/-	
3.	Viveiro 1	23/01/12	Thompson	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	-/-	
4.	Viveiro 1	23/01/12	Thompson	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	-/-	
5.	Viveiro 1	23/01/12	Thompson	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	-/-	
6.	Viveiro 1	23/01/12	Sugraone	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	-/-	
7.	Viveiro 1	23/01/12	Sugraone	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	+ ⁿ /+	
8.	Viveiro 1	23/01/12	Sugraone	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	-/-	
9.	Viveiro 1	23/01/12	Sugraone	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	-/-	
10.	Viveiro 1	23/01/12	Sugraone	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	-/-	
11.	Viveiro 1	23/01/12	Crimson	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	-/-	
12.	Viveiro 1	23/01/12	Crimson	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	-/-	
13.	Viveiro 1	23/01/12	Crimson	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	-/-	
14.	Viveiro 1	23/01/12	Crimson	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	-/-	
15.	Viveiro 1	23/01/12	Crimson	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	-/-	
16.	Viveiro 1	23/01/12	Brasil	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	-/-	
17.	Viveiro 1	23/01/12	Brasil	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	-/-	
18.	Viveiro 1	23/01/12	Brasil	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	-/-	
19.	Viveiro 1	23/01/12	Brasil	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	-/-	
20.	Viveiro 1	23/01/12	Brasil	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	-/-	
21.	Viveiro 1	23/01/12	Itália	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	-/-	
22.	Viveiro 1	23/01/12	Itália	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	+C	
23.	Viveiro 1	23/01/12	Itália	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	-/-	
24.	Viveiro 1	23/01/12	Itália	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	-/-	
25.	Viveiro 1	23/01/12	Itália	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	-/-	
26.	Viveiro 1	23/01/12	Benitaka	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	-/-	
27.	Viveiro 1	23/01/12	Benitaka	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	-+	
28.	Viveiro 1	23/01/12	Benitaka	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	-/-	
29.	Viveiro 1	23/01/12	Benitaka	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	-/-	
30.	Viveiro 1	23/01/12	Benitaka	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	-/-	
31.	Viveiro 2	25/01/12	IAC 313	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	-/-	
32.	Viveiro 2	25/01/12	IAC 313	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	-/-	
33.	Viveiro 2	25/01/12	IAC 313	Não	Não realizado	30/01/12	02/02	-/-	03/02	-/-	

34.	Viveiro 2	25/01/12	IAC 313	Não	Não realizado	30/01/12	06/02	-/-	03/02	-/-	
35.	Viveiro 2	25/01/12	IAC 313	Não	Não realizado	30/01/12	06/02	-/-	03/02	-/-	
36.	Viveiro 2	25/01/12	Harmony	Não	Não realizado	30/01/12	06/02	-/-	03/02	-/-	
37.	Viveiro 2	25/01/12	Harmony	Não	Não realizado	30/01/12	06/02	-/-	03/02	-/-	
38.	Viveiro 2	25/01/12	Harmony	Não	Não realizado	30/01/12	06/02	-/-	03/02	-/-	
39.	Viveiro 2	25/01/12	Harmony	Não	Não realizado	30/01/12	06/02	-/-	03/02	-/-	
40.	Viveiro 2	25/01/12	Harmony	Não	Não realizado	30/01/12	06/02	-/-	03/02	-/-	
41.	Viveiro 2	25/01/12	IAC 572	Não	Não realizado	30/01/12	06/02	-/-	03/02	-/-	
42.	Viveiro 2	25/01/12	IAC 572	Não	Não realizado	30/01/12	06/02	-/-	03/02	-/-	
43.	Viveiro 2	25/01/12	IAC 572	Não	Não realizado	30/01/12	06/02	-/-	03/02	-/-	
44.	Viveiro 2	25/01/12	IAC 572	Não	Não realizado	30/01/12	06/02	-/-	03/02	-/-	
45.	Viveiro 2	25/01/12	IAC 572	Não	Não realizado	30/01/12	06/02	-/-	03/02	-/-	
46.	Viveiro 2	25/01/12	Italia	Não	Não realizado	30/01/12	06/02	-/-	03/02	-/-	
47.	Viveiro 2	25/01/12	Italia	Não	Não realizado	30/01/12	06/02	-/-	03/02	-/-	
48.	Viveiro 2	25/01/12	Italia	Não	Não realizado	30/01/12	06/02	-/-	03/02	-/-	
49.	Viveiro 2	25/01/12	Italia	Não	Não realizado	30/01/12	06/02	-/-	03/02	-/-	
50.	Viveiro 2	25/01/12	Italia	Não	Não realizado	30/01/12	06/02	-/-	03/02	-/-	
51.	Viveiro 2	25/01/12	Italia	Não	Não realizado	30/01/12	06/02	-/-	03/02	C/C	
52.	Viveiro 2	25/01/12	Italia	Não	Não realizado	30/01/12	06/02	-/-	03/02	-/-	
53.	Viveiro 2	25/01/12	Italia	Não	Não realizado	30/01/12	06/02	-/-	03/02	-/-	
54.	Viveiro 2	25/01/12	Italia	Não	Não realizado	30/01/12	06/02	-/-	03/02	-/-	
55.	Viveiro 2	25/01/12	Italia	Não	Não realizado	30/01/12	06/02	-/-	03/02	-/-	
56.	Viveiro 2	25/01/12	Italia	Não	Não realizado	30/01/12	06/02	-/-	03/02	-/-	
57.	Viveiro 2	25/01/12	Italia	Não	Não realizado	30/01/12	06/02	-/-	03/02	-/-	
58.	Viveiro 2	25/01/12	Italia	Não	Não realizado	30/01/12	06/02	-/-	03/02	-/-	
59.	Viveiro 2	25/01/12	Italia	Não	Não realizado	30/01/12	06/02	-/-	03/02	-/-	
60.	Viveiro 2	25/01/12	Italia	Não	Não realizado	30/01/12	06/02	-/-	03/02	-/-	
61.	Área de Produção 1	25/01/12	Red Globe	Sim	+ ^c	30/01/12	06/02	+/+	03/02	+/+	RG/CS/1
62.	Área de Produção 1	25/01/12	Red Globe	Sim	+	30/01/12	06/02	+/+	03/02	+/+	RG/CS/2
63.	Área de Produção 1	25/01/12	Red Globe	Sim	+	30/01/12	06/02	+/+	03/02	-/+	RG/CS/3
64.	Área de Produção 1	25/01/12	Red Globe	Sim	+	30/01/12	06/02	-/+	03/02	+/+	RG/CS/4
65.	Área de Produção 1	25/01/12	Red Globe	Sim	+	30/01/12	06/02	+/+	03/02	+/+	RG/CS/5
66.	Área de Produção 1	25/01/12	Red Globe	Sim	+	30/01/12	06/02	-/+	03/02	+/+	RG/CS/6
67.	Área de Produção 1	25/01/12	Red Globe	Sim	+	30/01/12	07/02	+/+	03/02	+/+	RG/CS/7
68.	Área de Produção 1	25/01/12	Red Globe	Sim	+	30/01/12	07/02	+/+	04/02	+/+	RG/CS/8
69.	Área de Produção 1	25/01/12	Red Globe	Sim	+	30/01/12	07/02	+/+	04/02	+/+	RG/CS/9
70.	Área de Produção 1	25/01/12	Red Globe	Sim	+	30/01/12	07/02	+/+	04/02	+/+	RG/CS/10
71.	Área de Produção 1	25/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	30/01/12	07/02	-/-	04/02	-/-	RG/SS/1
72.	Área de Produção 1	25/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	30/01/12	07/02	-/-	04/02	-/-	RG/SS/2
73.	Área de Produção 1	25/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	30/01/12	07/02	-/-	04/02	-/+	RG/SS/3
74.	Área de Produção 1	25/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	30/01/12	07/02	-/-	04/02	-/+	RG/SS/4
75.	Área de Produção 1	25/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	30/01/12	07/02	-/-	04/02	+/+	RG/SS/5

76.	Área de Produção 1	25/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	30/01/12	07/02	-/-	04/02	-/-	RG/SS/6
77.	Área de Produção 1	25/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	30/01/12	07/02	-/-	04/02	-/-	RG/SS/7
78.	Área de Produção 1	25/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	30/01/12	07/02	-/-	04/02	-/-	RG/SS/8
79.	Área de Produção 1	25/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	30/01/12	07/02	-/-	04/02	+/+	RG/SS/9
80.	Área de Produção 1	25/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	30/01/12	07/02	-/-	04/02	-/+	RG/SS/10
81.	Área de Produção 2	26/01/12	Red Globe	Sim	+	30/01/12	07/02	-/-	04/02	+/+	RG/CS/1
82.	Área de Produção 2	26/01/12	Red Globe	Sim	+	30/01/12	07/02	-/-	04/02	+/+	RG/CS/2
83.	Área de Produção 2	26/01/12	Red Globe	Sim	- ^d	30/01/12	07/02	-/-	04/02	+/+	RG/CS/3
84.	Área de Produção 2	26/01/12	Red Globe	Sim	+	30/01/12	07/02	-/-	04/02	+/+	RG/CS/4
85.	Área de Produção 2	26/01/12	Red Globe	Sim	+	30/01/12	07/02	-/-	04/02	+/+	RG/CS/5
86.	Área de Produção 2	26/01/12	Red Globe	Sim	+	30/01/12	07/02	-/+	04/02	+/+	RG/CS/6
87.	Área de Produção 2	26/01/12	Red Globe	Sim	-	30/01/12	07/02	+/+	04/02	+/+	RG/CS/7
88.	Área de Produção 2	26/01/12	Red Globe	Sim	+	30/01/12	07/02	-/-	04/02	+/+	RG/CS/8
89.	Área de Produção 2	26/01/12	Red Globe	Sim	+	30/01/12	07/02	+/-	04/02	C/+	RG/CS/9
90.	Área de Produção 2	26/01/12	Red Globe	Sim	+	30/01/12	07/02	+/+	04/02	+/-	RG/CS/10
91.	Área de Produção 2	26/01/12	Red Globe	Sim	+	30/01/12	07/02	+/+	04/02	+/+	RG/CS/11
92.	Área de Produção 2	26/01/12	Red Globe	Sim	+	30/01/12	07/02	+/+	04/02	+/+	RG/CS/12
93.	Área de Produção 2	26/01/12	Red Globe	Sim	+	30/01/12	07/02	+/+	04/02	+/+	RG/CS/13
94.	Área de Produção 2	26/01/12	Red Globe	Sim	+	30/01/12	07/02	+/+	04/02	C/+	RG/CS/14
95.	Área de Produção 2	26/01/12	Red Globe	Sim	-	30/01/12	07/02	-/+	04/02	+/+	RG/CS/15
96.	Área de Produção 2	26/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	31/01/12	07/02	-/-	04/02	-/-	RG/SS/1
97.	Área de Produção 2	26/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	31/01/12	07/02	-/-	04/02	-/-	RG/SS/2
98.	Área de Produção 2	26/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	31/01/12	07/02	-/-	04/02	-/-	RG/SS/3
99.	Área de Produção 2	26/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	31/01/12	07/02	-/-	04/02	-/-	RG/SS/4
100.	Área de Produção 2	26/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	31/01/12	07/02	-/-	04/02	-/-	RG/SS/5
101.	Área de Produção 2	26/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	31/01/12	07/02	-/-	04/02	-/-	RG/SS/6
102.	Área de Produção 2	26/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	31/01/12	07/02	-/-	04/02	-/+	RG/SS/7
103.	Área de Produção 2	26/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	31/01/12	07/02	-/-	04/02	-/+	RG/SS/8
104.	Área de Produção 2	26/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	31/01/12	07/02	-/-	04/02	-/-	RG/SS/9
105.	Área de Produção 2	26/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	31/01/12	07/02	-/-	04/02	-/-	RG/SS/10
106.	Área de Produção 2	26/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	31/01/12	07/02	-/-	04/02	-/-	RG/SS/11
107.	Área de Produção 2	26/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	31/01/12	07/02	-/-	04/02	+/-	RG/SS/12
108.	Área de Produção 2	26/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	31/01/12	07/02	-/-	04/02	-/-	RG/SS/13
109.	Área de Produção 2	26/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	31/01/12	07/02	-/-	04/02	-/+	RG/SS/14
110.	Área de Produção 2	26/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	31/01/12	07/02	-/-	04/02	-/-	RG/SS/15
111.	Área de Produção 3	26/01/12	Red Globe	Sim	+	31/01/12	07/02	-/-	04/02	+/+	RG/CS1
112.	Área de Produção 3	26/01/12	Red Globe	Sim	+	31/01/12	07/02	+/+	04/02	+/+	RG/CS/2
113.	Área de Produção 3	26/01/12	Red Globe	Sim	-	31/01/12	07/02	-/-	04/02	+/+	RG/CS/3
114.	Área de Produção 3	26/01/12	Red Globe	Sim	+	31/01/12	07/02	-/-	04/02	-/+	RG/CS/4
115.	Área de Produção 3	26/01/12	Red Globe	Sim	-	31/01/12	07/02	-/-	04/02	-/-	RG/CS/5
116.	Área de Produção 3	26/01/12	Red Globe	Sim	+	31/01/12	07/02	+/+	04/02	+/+	RG/CS/6
117.	Área de Produção 3	26/01/12	Red Globe	Sim	+	31/01/12	07/02	+/+	04/02	+/+	RG/CS/7
118.	Área de Produção 3	26/01/12	Red Globe	Sim	+	31/01/12	07/02	+/+	04/02	+/+	RG/CS/8

119.	Área de Produção 3	26/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	31/01/12	07/02	-/-	04/02	-/-	RG/SS/1
120.	Área de Produção 3	26/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	31/01/12	07/02	-/-	04/02	-/-	RG/SS/2
121.	Área de Produção 3	26/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	31/01/12	07/02	-/-	04/02	-/-	RG/SS/3
122.	Área de Produção 3	26/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	31/01/12	07/02	-/-	04/02	-/-	RG/SS/4
123.	Área de Produção 3	26/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	31/01/12	07/02	-/-	04/02	-/-	RG/SS/5
124.	Área de Produção 3	26/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	31/01/12	07/02	-/-	04/02	+/-	RG/SS/6
125.	Área de Produção 3	26/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	31/01/12	07/02	-/-	04/02	-/-	RG/SS/7
126.	Área de Produção 3	26/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	31/01/12	07/02	-/-	04/02	+/+	RG/SS/8
127.	Área de Produção 3	26/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	31/01/12	07/02	-/-	04/02	-/-	RG/SS/9
128.	Área de Produção 3	26/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	31/01/12	07/02	-/-	04/02	-/-	RG/SS/10
129.	Área de Produção 3	26/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	31/01/12	07/02	-/-	04/02	+/+	RG/SS/11
130.	Área de Produção 3	26/01/12	Red Globe	Não	Não realizado	31/01/12	07/02	-/-	04/02	-/-	RG/SS/12

-^a: PCR negativa; +^b: PCR positiva; +^c: Isolamento positivo; -^d: Isolamento negativo; C: Contaminado; RG/CS: Amostra de folhas Red Gloge com sintoma; RG/SS: Amostra de folhas Red Globe sem sintoma.