

Consórcio Setentrional de Educação a Distância
Universidade de Brasília e Universidade Estadual de Goiás
Curso de Licenciatura em Biologia a Distância

**OTIMIZAÇÃO DA PCR PARA DETECÇÃO DE *Xanthomonas*
campestris pv. *viticola* EM VIDEIRAS ASSINTOMÁTICAS**

TATIANA DAVID MIRANDA

BRASÍLIA

2011

TATIANA DAVID MIRANDA

**OTIMIZAÇÃO DA PCR PARA DETECÇÃO DE *Xanthomonas*
campestris pv. *viticola* EM VIDEIRAS ASSINTOMÁTICAS**

Monografia apresentada, como exigência parcial para a obtenção do grau pelo Consórcio Setentrional de Educação a Distância, Universidade de Brasília no curso de Licenciatura em Biologia a distância.

BRASÍLIA

2011

TATIANA DAVID MIRANDA

OTIMIZAÇÃO DA PCR PARA DETECÇÃO DE *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* EM VIDEIRAS ASSINTOMÁTICAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência parcial para a obtenção do grau de Licenciado em Biologia do Consórcio Setentrional de Educação a Distância, Universidade de Brasília.

Aprovado em junho de 2011.

Profa. Dra. Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira
Departamento de Fitopatologia -Universidade de Brasília
Orientadora

Profa. Ms. Lanuse Caixeta Zanotta
Universidade de Brasília
Coorientadora

Prof. Ms. Gil Amaro
Universidade de Brasília
Avaliador I

Prof. Esp. Lívio Dantas Carneiro
Universidade de Brasília
Avaliador II

**Brasília
2011**

À minha avó Adelir Corrêa da Silva (in memorian),

“Se agora conquisto mais uma vitória, é porque um dia estive ao meu lado e me ensinou a seguir pelo bom caminho. Hoje especialmente a saudade é mais forte, mas a lembrança da sua voz amiga, de seu sorriso, de seu abraço, realimenta o amor que jamais se apagará do meu coração.

Sei que estará sempre ao meu lado e, neste momento, sinto seu peito pleno de orgulho e seus olhos banhados de emoção. Sinto sua presença, ouço seus aplausos. Poderia dizer-lhe tanta coisa, mas me calo. Só o silêncio pode dizer o que sinto.”

(Autor desconhecido)

Por todo amor, dedicação e carinho

DEDICO.

Aos meus pais Sidney e Cleidina,
às minhas irmãs Ana Beatriz, Carolina e Camila
e ao meu noivo e companheiro Vanderlei,
por todo amor, paciência e compreensão

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela vida e por mais esta conquista.

Aos meus pais Sidney e Cleidina pelo apoio incondicional, incentivo, amor e carinho.

Às minhas irmãs Ana Beatriz, Carolina e Camila pelos momentos de descontração, incentivo e apoio nas horas difíceis.

Ao meu noivo Vanderlei por toda paciência, compreensão, incentivo e amor.

À professora Marisa Ferreira pela oportunidade concedida, pelos valiosos ensinamentos, pela paciência, amizade e orientação.

À professora tutora Lanuse Zanotta pela orientação e amizade.

Às colegas e companheiras de laboratório Claudênia e Anna Cristina pelo apoio e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília que me ajudaram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho.

Aos tutores e monitores do LicBio que tornaram possível a conclusão deste curso.

A todos aqueles que tornaram possível a conclusão desta etapa.

“A Terra provê o suficiente para as necessidades de todos os homens, mas não para a voracidade de todos”.

Mahatma Gandhi

RESUMO

MIRANDA, Tatiana David. **Otimização da PCR para Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em Videiras Assintomáticas**. 2011. 37f. Trabalho de Conclusão de Curso Licenciatura em Ciências Biológicas – Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

O cancro bacteriano da videira, causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* Nayudu (Dye), foi detectado no Brasil pela primeira vez em 1998, no município de Petrolina, Pernambuco. Posteriormente, casos da doença foram relatados na Bahia, Piauí, Ceará, Goiás e Roraima. O cancro da videira representa a doença bacteriana mais importante da região do Vale do Submédio São Francisco, apresentando incidência expressiva e grande importância econômica. Considerando a crescente preocupação com o uso de material propagativo livre da doença, a possibilidade de sua disseminação para outras regiões produtoras e a necessidade de comprovação da sanidade de mudas, este trabalho teve como objetivo a detecção de *X.c.* pv. *viticola* em frutos e cachos assintomáticos, de forma a otimizar a detecção molecular do patógeno, e de determinar o limite mínimo de detecção da bactéria por PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) e Bio-PCR aliado ao uso de meio semi-seletivo NYDAM. Nos ensaios realizados para detecção de *X.c.* pv. *viticola* foram utilizados cachos de videira inoculados artificialmente com suspensões de diferentes concentrações da bactéria. Os cachos inoculados foram lavados e foi realizada a PCR direta após centrifugação de alíquotas do lavado. Para a Bio-PCR, foi utilizada uma etapa de enriquecimento da população bacteriana presente nos frutos em meio NYDAM. Os ensaios demonstraram que é possível detectar *X.c.* pv. *viticola* a partir de frutos assintomáticos que possuem uma baixa concentração de células da bactéria aderidas a sua superfície ($\sim 10^3$ ufc/ml), por meio da Nested-PCR realizada direto do lavado destes frutos ou através da Bio-PCR. Os resultados indicaram que o tempo de enriquecimento influenciou diretamente na sensibilidade do método de detecção, assim como a diluição do lavado das placas.

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Colônias de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> em meio 523 de Kado (KADO & HESKETT, 1970).....	13
FIGURA 2. Sintomas do cancro bacteriano da videira, causado por <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> : A. Pontos necróticos na folha; B. Intensa queima foliar e manchas angulares acompanhando, principalmente, as nervuras; C e D. Cancros típicos da doença em ramos de videira; E. Necrose da ráquis e pedicelo.....	16
FIGURA 3. Sintomas do cancro bacteriano da videira nas bagas: A e B. Lesões necróticas.....	17
FIGURA 4. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da Bio-PCR de cachos de videira inoculados artificialmente com três diferentes tratamentos: água, suspensão a 10^3 ufc/ml e suspensão a 10^8 ufc/ml, utilizando o par de iniciadores Xcv1F/Xcv3R. M – Marcador 100pb DNA Ladder (Ludwig - Biotec); CN – Controle Negativo – água; 1 a 4 – amostras inoculadas com água; 5 a 13 – amostras inoculadas com suspensão a 10^3 ufc/ml; 14 a 22 – amostras inoculadas com suspensão a 10^8 ufc/ml; 23 – Suspensão do crescimento bacteriano em meio de cultura do isolado A-2 após 72 horas; 24 – Suspensão a 10^3 ufc/ml (isolado A-2), utilizada para inoculação nos frutos; 25 – Suspensão a 10^8 ufc/ml (isolado A-2), utilizada para pulverização nos frutos; 26 – Suspensão do crescimento bacteriano em meio de cultura da suspensão 10^8 ufc/ml (isolado A-2) após 48 horas e CP – Controle Positivo (DNA purificado do isolado A-2).....	29
FIGURA 5. Ciclo do cancro bacteriano da videira causado por <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i>	36

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Variações do protocolo por experimento.....	25
TABELA 2. Detecção molecular de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> em frutos assintomáticos de videira inoculados artificialmente.....	28
TABELA 3. Relação de cultivares de videira e seus respectivos graus de suscetibilidade à <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i>	37

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
1. A CULTURA DA VIDEIRA	11
2. O CANCRO BACTERIANO DA VIDEIRA	12
CAPÍTULO 2 - OTIMIZAÇÃO DA DETECÇÃO MOLECULAR DE <i>XANTHOMONAS</i>	
<i>CAMPESTRIS</i> PV. <i>VITICOLA</i> EM VIDEIRAS ASSINTOMÁTICAS	19
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 – <i>Isolado bacteriano e produção de inóculo.....</i>	<i>22</i>
3.2 – <i>Inoculação artificial de cachos de videira.....</i>	<i>22</i>
3.3 – <i>Recuperação da bactéria por lavagem, sedimentação e plaqueamento</i>	<i>23</i>
3.4 – <i>PCR e eletroforese em gel de agarose</i>	<i>23</i>
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5. CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
ANEXOS.....	35
ANEXO I	36
ANEXO II.....	37

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. A CULTURA DA VIDEIRA

A videira (*Vitis* spp.) pertence à ordem *Rhamnales*, à família *Vitaceae* e ao gênero *Vitis*, que possui cerca de 50 espécies conhecidas. Aproximadamente 35 destas apresentam algum valor econômico para cultivo ou para fins de melhoramento genético. As espécies *Vitis vinifera* L. (de origem europeia) e *Vitis labrusca* L. (de origem americana) destacam-se dentre as demais devido a primeira ser conhecida como produtora de uvas finas, e a segunda como produtora de uvas rústicas. As variedades da espécie *V. vinifera* apresentam baixa resistência a algumas doenças e são altamente exigentes em tratos culturais (SILVA & CORREIA, 2000).

A videira é uma das frutíferas mais plantadas no mundo. Existem cerca de 10 mil variedades, adaptadas aos mais diversos tipos de clima e de solo. Assim, as videiras são cultivadas tanto em regiões de clima tropical quanto em regiões de clima temperado, contudo em áreas tropicais e subtropicais elas podem apresentar maior crescimento, podendo produzir mais de uma safra ao ano (PEARSON & GOHEEN, 1998). Além disso, as uvas são extremamente sensíveis, variando de acordo com as condições edafoclimáticas do ambiente em que se desenvolvem, podendo apresentar variações no sabor, tamanho, formato, coloração, entre outros.

A viticultura pode ser realizada em praticamente todo território brasileiro. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE – (2011), atualmente os estados produtores são: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Bahia e Pernambuco. Entretanto, a viticultura está sendo implantada em outros estados como Mato Grosso do Sul, Goiás, Espírito Santo, Ceará e Piauí (MELLO, 2010). No Brasil, seu cultivo é destinado à produção de frutas *in natura*, sucos, vinhos e outros derivados.

Existem dois tipos de uvas de mesa sendo produzidos no Brasil: as uvas comuns de mesa, na qual a maior parte é constituída de variedades ou híbridas de *V. labrusca*, têm como

características bagas médias a grandes e polpa mucilaginosa, sendo as variedades Isabel e Niagara exemplos deste grupo; e as uvas finas de mesa, que abrangem em sua maioria variedades da espécie *V. vinifera*, tendo como características bagas grandes e polpa carnosas. Fazem parte deste grupo as cultivares (cvs.) Red Globe e Itália.

O pólo frutícola Petrolina-PE/Juazeiro-BA, situado no Vale do Submédio São Francisco, é o principal centro produtor e exportador de uvas de mesa do Brasil, sendo responsável por 95% das exportações nacionais de uvas finas de mesa. Essa região possui mais de 9000 hectares de área cultivada (OLIVEIRA et al., 2008/2009).

No Vale do Submédio São Francisco, a cultura da videira tem se expandido significativamente nos últimos anos, destacando-se pelos altos rendimentos alcançados e pela qualidade do produto. Isso se deve às condições edafoclimáticas encontradas no semiárido que, aliadas ao manejo das podas, ao controle hídrico com o uso de técnicas modernas de irrigação, e à aplicação de fertilizantes, defensivos e agentes químicos reguladores, garantem um rápido crescimento dos vinhedos. Dessa forma, é possível que em 1 ano e meio após o plantio obtenha-se a primeira safra, e que sejam obtidas até 2,5 safras ao ano, superando a produtividade média nacional (SILVA & CORREIA, 2000).

Segundo Silva e Correia (2000), a viticultura destaca-se, também, pela grande importância socioeconômica para a região semiárida do Brasil, gerando um elevado número de empregos diretos e indiretos. A videira cultivada no nordeste gera cerca de 5 empregos/hectare/ano, representando o maior índice entre as culturas perenes e anuais.

2. O CANCRO BACTERIANO DA VIDEIRA

A rápida expansão do cultivo da videira e a introdução de novas variedades, além das condições climáticas predominantes no Vale do Submédio São Francisco, favorecem o surgimento de problemas fitossanitários – entre os quais se destaca o cancro bacteriano – que, se não forem contornados, podem trazer sérios prejuízos econômicos.

Em 1998, foi detectado pela primeira vez no Brasil, em parreirais do Vale do São Francisco no município de Petrolina, Pernambuco, o cancro bacteriano da videira causado

pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* Nayudu (Dye) (MALAVOLTA JR. et al., 1999a; LIMA et al., 1999). Foram coletadas amostras da variedade Red Globe (*V. vinifera*) exibindo sintomas nas folhas, pecíolos, hastes e ramos e, após isolamentos e testes bioquímicos, foi comprovado que se tratava da bactéria *X.c.* pv. *viticola* (MALAVOLTA JR. et al., 1999a). Esse foi o segundo relato desta bacteriose no mundo, sendo que o primeiro relato ocorreu na Índia em 1972 (NAYUDU, 1972).

A bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, descrita como *Pseudomonas viticola* sp. nov. por Nayudu (1972), apresenta células em forma de bastonete com dimensões de 1,2 a 2,5µm, possui um flagelo polar, não utiliza nitrato como fonte de nitrogênio e não utiliza asparagina como principal fonte de carbono e nitrogênio. Suas colônias são arredondadas, convexas, brilhantes com bordos lisos, de coloração creme-esbranquiçada em meio ágar-nutritivo, devido a não produção de xanthomonadina – pigmento característico das bactérias do gênero *Xanthomonas* (Figura 1). São gram-negativas, oxidativas, crescem bem em sais de amônio e ácido glutâmico, embora seu melhor crescimento seja em caseína hidrolisada (NAYUDU, 1972). Temperaturas em torno de 25 a 30°C e alta umidade relativa do ar são condições que favorecem o desenvolvimento da bactéria.

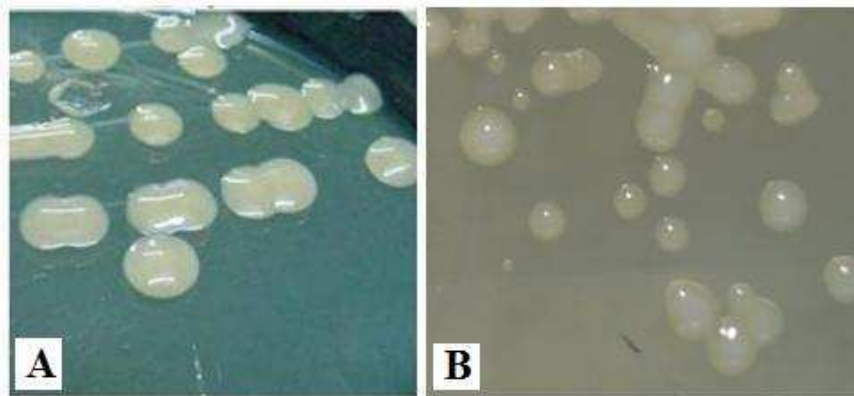


FIGURA 1. Colônias de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em meio 523 de Kado (KADO & HESKETT, 1970). **Figura 1A:** de Halfeld-Vieira e Nechet (2006).

É possível que o patógeno responsável pelo cancro bacteriano da videira tenha sido inadvertidamente introduzido no Brasil através de estacas da variedade Red Globe, originárias da Índia. Casos da doença já foram relatados nos estados de Pernambuco, Bahia, Piauí, Ceará, Goiás e Roraima (MALAVOLTA JR. et al., 1999a; LIMA et al., 1999; ARAÚJO et al., 1999; MALAVOLTA JR. et al., 1999b; FREIRE & OLIVEIRA, 2001; JUNQUEIRA et al., 2006; HALFELD-VIEIRA & NECHET, 2006).

Inicialmente, a doença foi observada em plantios novos, com incidência de até 100% em Red Globe e em cultivares de uvas sem sementes. Já foram registrados sintomas do cancro bacteriano em videiras das cultivares: Red Globe, Perlette, Itália, Festival, Brasil, Ribier, Piratininga, Patrícia, Catalunha e Benitaka. As variedades pertencentes à espécie *V. vinifera* são mais suscetíveis ao cancro bacteriano do que as pertencentes à *V. labrusca* (MALAVOLTA Jr. et al., 2003) (Anexo II, Tabela 3).

O cancro bacteriano da videira apresenta atualmente incidência expressiva e grande importância econômica, sendo a doença bacteriana da videira de maior importância na região do Vale do São Francisco. Essa doença impede o trânsito de materiais propagativos a partir dos estados onde a bactéria foi detectada, limita o acesso da uva da região nos mercados interno e externo, além de pôr em risco a competitividade da região em termos de produtividade. Isso porque a bactéria *X.c. pv. viticola* é considerada uma praga quarentenária A2 – de importância econômica potencial, mas 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 - (BRASIL, 2008).

Os sintomas da bacteriose nas videiras do Vale do São Francisco aparecem preferencialmente no primeiro semestre do ano, em épocas que apresentam alta umidade relativa e temperatura elevada, período em que a infecção é mais intensa (ARAÚJO et al., 1999). Em plantas infectadas, os sintomas do cancro bacteriano na folha surgem inicialmente como pontos necróticos, com ou sem halos amarelados, podendo coalescer causando crestamento e destruição de extensas áreas do limbo foliar (Figura 2 A e B). Essas lesões podem se concentrar em grande número nos bordos da folha, ao redor de ferimentos e nas nervuras. Também pode ocorrer nas folhas a formação de manchas setoriais e pardacentas (NASCIMENTO et al., 2000).

Nas nervuras e pecíolos das folhas, nas ráquis dos frutos e nos ramos os sintomas observados são manchas escuras e alongadas, que com a evolução da infecção, transformam-se em cancos podendo atingir de 3 a 5 cm de extensão, aprofundando-se nos tecidos e atingindo os vasos condutores, provocando o colapso no transporte da seiva (FREIRE & OLIVEIRA, 2001) (Figura 2 C, D e E).

Os sintomas do cancro bacteriano da videira afetam inflorescências, causando necrose em cachos já formados, o que compromete os ramos produtivos e reduz a produção (Figura 1E). As bagas são desuniformes em tamanho e cor, podendo apresentar lesões necróticas, grosseiramente arredondadas, semelhantes a cancos (MALAVOLTA JR. et al., 1999a) (Figura 3). De acordo com LIMA (2000), em cachos já formados são observados sintomas de murcha em bagas, após a necrose da ráquis e pedicelo. A intensidade dos sintomas causados pela bactéria varia de acordo com o nível de tolerância de cada variedade à doença, e segundo as condições ambientais.

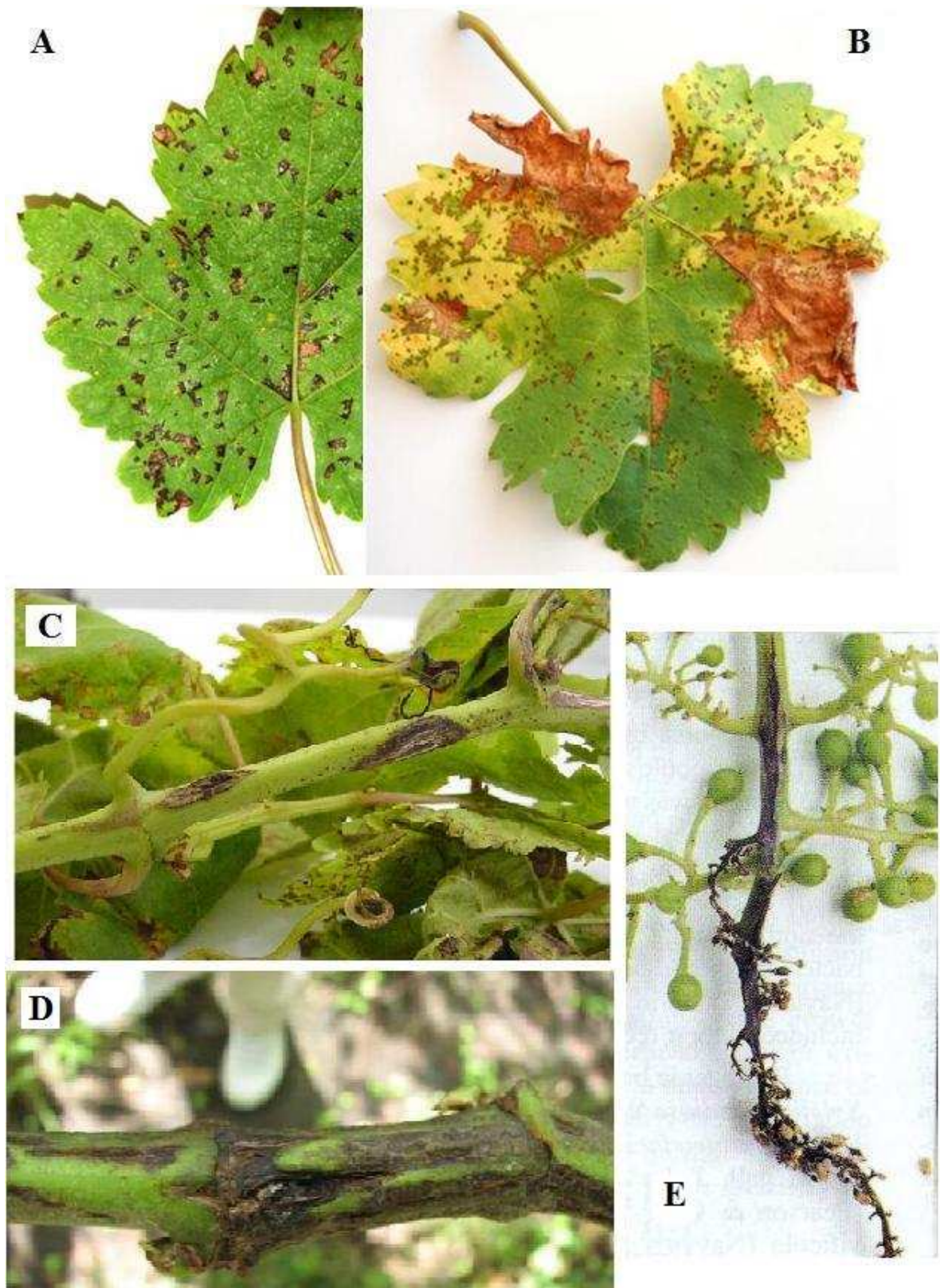


FIGURA 2. Sintomas do cancro bacteriano da videira, causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*: **2A.** Pontos necróticos na folha (L.C. TRINDADE); **2B.** Intensa queima foliar e manchas angulares acompanhando, principalmente, as nervuras (HALFELD-VIEIRA & NECHET, 2008); **2C e 2D.** Cancros típicos da doença em ramos de videira (**2C:** HALFELD-VIEIRA & NECHET, 2008; **2D:** L.C. TRINDADE); **2E.** Necrose da ráquis e pedicelo (LIMA et al., 1999).

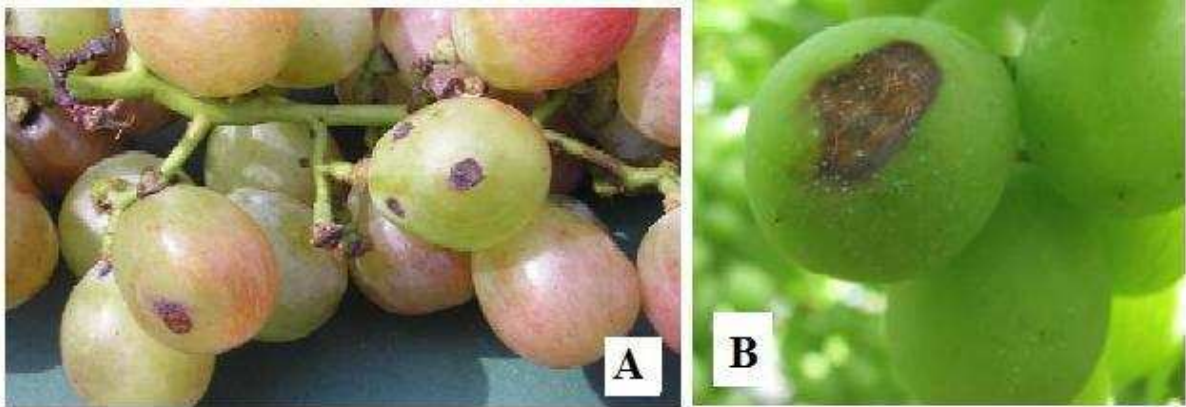


FIGURA 3. Sintomas do cancro bacteriano da videira nas bagas. **3A e 3B:** Lesões necróticas (**3A:** TRINDADE, 2007; **3B:** L.C. TRINDADE).

Segundo Silva (2009), a bactéria *X.c. pv. viticola* foi capaz de sobreviver em tecidos infectados de videira na superfície do solo, por pelo menos 80 dias em altas populações. Essa constitui uma fonte de inóculo primário para plantas saudias. Essa bactéria também é capaz de sobreviver em ramos de videira, associada a infecções latentes nas plantas assintomáticas, nos cancos formados pela doença e na superfície de hastes e folhas com sintomas do cancro bacteriano, inclusive em folhas assintomáticas provenientes de áreas afetadas pela doença. Isso demonstra a importância dos órgãos vegetativos da videira como fonte de disseminação da bactéria. Assim, este patógeno pode ser disseminado através de restos de cultura infectados espalhados pelo pomar ou aderidos a veículos, a roupas, e principalmente a: contentores, tesouras, luvas e canivetes utilizados na colheita de frutos de plantas doentes que não foram desinfestados após o uso (MARIANO et al., 2001). A longas distâncias a disseminação ocorre por respingos de água de chuva ou irrigação. Ainda que, no Vale do Submédio São Francisco tenha um curto período de chuvas, a disseminação desta bactéria ocorre com maior rapidez durante esse período (ARAÚJO et al., 1999; NASCIMENTO et al., 2000).

Formas de irrigação do tipo sobre-copa, como a aspersão convencional e o pivô central, favorecem a disseminação da bactéria no parreiral. Os tratos culturais como: a poda, o raleio de bagas, a colheita, a desbrota, a torção de ramos, a gradagem, a capina, a roçagem, as pulverizações e a aplicação de herbicidas por barra também favorecem a distribuição da doença (MARIANO et al., 2001).

Todos agentes de ferimento da planta são importantes para a penetração do patógeno, principalmente os tratos culturais e o vento forte. A bactéria se multiplica rapidamente após a

penetração, colonizando os espaços intercelulares e atingindo os vasos condutores, sendo transmitida a todos os órgãos da planta (MARIANO et al., 2001).

A aquisição de material propagativo, como mudas e estacas sem certificação, tem contribuído para a introdução de *X.c. pv. viticola* em parreirais nos quais a doença ainda não ocorreu. Mudas ou bacelos infectados irão originar plantas doentes, disseminando a bactéria.

O cancro bacteriano da videira pode ser controlado através da aquisição e do uso de material propagativo livre de infecção, associado a práticas de manejo que possam limitar a sobrevivência e a disseminação da bactéria.

O controle desta doença é complexo, pois não existem produtos registrados específicos para o cancro da videira. O controle químico para o cancro bacteriano da videira é realizado de forma preventiva, através da aplicação de compostos cúpricos e calda bordalesa logo após a poda, a brotação, e quando ocorrerem ferimentos nas plantas. O uso exclusivo de compostos a base de cobre nem sempre é efetivo para a cura da doença, tendo em vista que existem estirpes de *X.c. pv. viticola* que apresentaram variabilidade na tolerância ao cobre (MARQUES, 2007; MARQUES et al., 2009).

Outras medidas preventivas são recomendadas de forma a interferir na dispersão da doença. Dentre estas ações, destacam-se: a poda de ramos doentes, queima de restos de cultura, erradicação de plantas severamente atacadas, desinfestação de ferramentas utilizadas no trato cultural e eliminação das plantas invasoras, que são possíveis hospedeiros alternativos do patógeno (PEIXOTO et al., 2007).

CAPÍTULO 2

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

1. INTRODUÇÃO

A bactéria fitopatogênica *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* é o agente causal do cancro bacteriano da videira. Essa doença afeta o cultivo de uvas de mesa na região de Petrolina-Juazeiro, no Vale do Rio São Francisco (LIMA et al., 1999).

O cancro bacteriano da videira foi detectado no Brasil pela primeira vez em 1998 e é uma doença de ocorrência geográfica ainda restrita neste país. Os primeiros relatos da doença ocorreram em Pernambuco e na Bahia (MALAVOLTA JR. et al., 1999a; LIMA et al., 1999; ARAÚJO et al., 1999). Mais tarde, focos foram registrados no Piauí, no Ceará, em Goiás e em Roraima (MALAVOLTA JR. et al., 1999b; FREIRE & OLIVEIRA, 2001; JUNQUEIRA et al., 2006; HALFELD-VIEIRA & NECHET, 2006). O trânsito de mudas constitui-se uma forma de introdução da bactéria em locais ainda não afetados por essa doença.

Trindade e colaboradores (2007) desenvolveram um método molecular capaz de detectar e identificar a bactéria causadora do cancro bacteriano da videira, a partir do uso da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos. A utilização de técnicas moleculares constitui uma ferramenta adicional às técnicas convencionais, como meios seletivos, testes de patogenicidade, testes bioquímicos e sorologia, permitindo maior rapidez e agilidade na detecção e identificação do patógeno. A PCR envolve sucessivas ampliações de regiões específicas do DNA do patógeno-alvo, por isso tem sido amplamente utilizada na diagnose de doenças de plantas.

Mesmo com o sucesso da PCR na identificação de *X.c.* pv. *viticola* em meio de cultura (TRINDADE et al., 2007), algumas dificuldades surgiram na adaptação do método para a detecção direta do patógeno em tecidos infectados, principalmente assintomáticos. Para reduzir este problema e aumentar a sensibilidade de detecção, adotou-se a Bio-PCR. Essa técnica envolve o enriquecimento em meio de cultura da população bacteriana associada ao

material a ser testado para, em seguida, ser realizada a PCR. Esse método pode ser aplicado a partes da planta com populações residentes da bactéria na superfície dos tecidos, mesmo assintomáticas.

Em alguns ensaios, durante o desenvolvimento da Bio-PCR para detecção de *X.c. pv. viticola*, foram observadas amostras com sintomas típicos do cancro, mas que não foram positivas por PCR, indicando a ocorrência de falsos negativos. Isso foi atribuído a alguns fatores: a presença de inibidores no meio de cultura usado (meio 523 de Kado) (KADO & HESKETT, 1970); a presença de populações bacterianas contaminantes que podem influenciar negativamente no crescimento de *X.c. pv. viticola*; e a distribuição irregular da bactéria nos tecidos infectados. O uso do meio semi-seletivo NYDAM (PEIXOTO et al., 2006), associado a coletas mais abrangentes, poderia minimizar estes problemas.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- Avaliar e otimizar a metodologia de recuperação de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em cachos e frutos assintomáticos bem como as condições de PCR com os iniciadores já disponíveis.
- Determinar o limite mínimo de detecção de *X.c.* pv. *viticola* em frutos e cachos de videira assintomáticos, através de Bio-PCR aliado ao uso do meio semi-seletivo NYDAM (PEIXOTO et al., 2006).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia Molecular do Departamento de Fitopatologia – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília – durante o período de maio de 2010 a maio 2011.

Foram realizados 5 experimentos (Tabela 1) com o objetivo de otimizar a metodologia de recuperação da bactéria em frutos, e determinar o limite mínimo de detecção de *X.c. pv. viticola* em cachos assintomáticos inoculados artificialmente. Em todos os experimentos foram empregados os mesmos procedimentos para cultivo da bactéria, produção de inóculo, inoculação, composição das reações e programa utilizado na PCR, conforme descritos abaixo.

3.1 – Isolado bacteriano e produção de inóculo

Para a realização dos ensaios, foi utilizado o isolado A-2, coletado em 2010 de ramos da cv. Red Globe, no Projeto Bebedouro em Petrolina, PE. Sua identificação foi anteriormente confirmada por PCR com os iniciadores específicos Xcv1F/Xcv3R. O isolado foi preservado em água Milli-Q estéril e mantido a temperatura ambiente.

Para a produção de inóculo, o isolado A-2 foi cultivado em meio 523 de Kado (KADO & HESKETT, 1970) ou em meio semi-seletivo NYDAM (PEIXOTO et al., 2006) a 28°C, durante 48-72 horas. Em seguida, foi preparada uma suspensão bacteriana concentrada ($\sim 10^9$ ufc/mL, com base na escala 7 de McFarland) que foi diluída em série em água destilada estéril para concentrações até 10^2 ufc/ml.

3.2 – Inoculação artificial de cachos de videira

Os cachos de videiras adquiridos no comércio local e aparentemente sadios foram separados em amostras de 100 a 110 g. Posteriormente, foi realizada uma lavagem desses em água corrente, e logo depois foi realizada uma desinfestação prévia dos frutos através de imersão em etanol 70% durante 10 a 15 minutos, seguida de três a cinco lavagens em água destilada.

Após esta etapa, as amostras foram inoculadas por pulverização com ~ 10 ml de suspensão a diferentes concentrações da bactéria, sendo o controle negativo pulverizado com

água estéril. Foram sempre realizadas de 2-4 repetições por tratamento. Os cachos, dispostos em bandejas de isopor, foram mantidos por 24 horas à temperatura ambiente para secagem.

3.3 – Recuperação da bactéria por lavagem, sedimentação e plaqueamento

Após 24 horas, as bagas e ráquis foram colocadas em 100 ml de água destilada estéril em Erlenmeyers de 250 ml, que foram acomodados em agitador horizontal (shaker) durante 1 hora e 30 minutos a 200 rpm. Em seguida, para a realização da PCR direta, foram retirados 0,5 a 1 ml do lavado dos frutos com três repetições e armazenados em microtubos Eppendorf de 1,5 ml. Essas amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 13.200 rpm e descartou-se o sobrenadante. O sedimento foi ressuscitado em 50 µl de água estéril. Com essas amostras foram realizadas a PCR e a Nested-PCR, conforme descrito abaixo no item 3.4.

Para a Bio-PCR, foram retirados 100 microlitros (µl) do lavado dos frutos e espalhados diretamente em meio NYDAM, com o auxílio de uma alça de Drigalski, totalizando de duas a três placas por amostra. Após 48-72 h a 28°C, todo o crescimento microbiano das placas foi lavado e coletado com 1 a 2 ml de água destilada estéril e armazenado em microtubos Eppendorf de 1,5 ml. O lavado das placas foi diluído com água estéril (1:10 ou 1:100) e guardado na geladeira até a realização da PCR.

3.4 – PCR e eletroforese em gel de agarose

Em todos os ensaios de PCR foram incluídos como controles positivos: uma suspensão de células da cultura pura da estirpe utilizada para a pulverização nos frutos (A-2) e o DNA purificado da bactéria. Como controle negativo da PCR usou-se reações sem DNA, apenas com adição de água.

Cada reação para amplificação do DNA de *X.c. pv. viticola* foi composta de 7,52 µl de água Milli-Q estéril, 1,20 µl de Tampão da Taq DNA polimerase 10X, 1,5mM de cloreto de magnésio, 100 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada iniciador (Xcv3R e Xcv1F), 1U de Taq DNA polimerase e 2,0 µl de DNA (a 10 ng/µl) ou do lavado das placas, completando um volume final de 12 µl.

O programa para amplificação consistiu de 5 etapas, onde na primeira etapa ocorre a elevação da temperatura a 95°C por 2 minutos para a desnaturação inicial, 30 ciclos de 95°C

por 1 minuto para desnaturação, 1 minuto a 64°C para anelamento dos *primers* e 2 minutos a 72°C para extensão, finalizando com um ciclo de 10 minutos a 72°C. Ao todo, essas etapas duram cerca de 2 horas e 30 minutos em termociclador PTC-100, MJ.

Para aumentar a sensibilidade da amplificação, foi realizada também a Nested-PCR, que emprega duas rodadas de PCR. A primeira é feita com os iniciadores RST2/Xcv3R, que amplificam fragmentos de 340 pares de bases (pb). Os produtos da primeira PCR são então diluídos com água (1:50) e usados como molde para a segunda, com o par de *primers* Xcv1F/Xcv3R, tendo como produto amplificado fragmentos de 240pb.

Após a amplificação do DNA, a detecção dos produtos amplificados foi feita através de eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TBE 0,5X, por cerca de 50 minutos a 90 V. Após a eletroforese, o gel foi corado durante 5 minutos em solução de brometo de etídeo (1,0 µg/ml) e descorado por 15 minutos em água destilada. Em seguida, o gel foi fotodocumentado sobre a luz ultravioleta através do sistema de captura de imagem L-PIX ST (Loccus Biotecnologia) (Figura 4).

TABELA 1. Variações do protocolo por experimento.

	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4	Experimento 5	
Tratamentos /nº de repetições	10 ⁸ ufc/ml / 3 CN* / 3	10 ³ ufc/ml / 3 10 ⁸ ufc/ml / 3 CN / 2	10 ³ ufc/ml / 3 10 ⁸ ufc/ml / 1 CN / 2	10 ³ ufc/ml / 3 10 ⁸ ufc/ml / 1 CN / 2	10 ² ufc/ml / 2 10 ³ ufc/ml / 2 10 ⁴ ufc/ml / 2 10 ⁵ ufc/ml / 2	10 ⁶ ufc/ml / 2 10 ⁷ ufc/ml / 2 10 ⁸ ufc/ml / 2 CN / 2
Quantidade de frutos por repetição	De 110 a 115 g	De 105 a 115 g	De 84 a 94 g	De 115 a 125 g	80 a 95 g	
Cultivar	Itália	Crimson	Crimson	Rubi	Moscatel	
Tempo de secagem	24 horas	24 horas	~2 horas	24 horas	24 horas	
Tempo de enriquecimento	48 horas	48 horas	72 horas	72 horas	ND**	
Diluição do lavado das placas	1:10	1:10	1:10	1:10 e 1:100	ND	

* Controle negativo: amostra inoculada apenas com água estéril.

** Não Desenvolvido.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível detectar a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* através de Bio-PCR em cachos de videiras inoculados artificialmente com uma suspensão de baixa concentração ($\sim 10^3$ ufc/ml), além da suspensão de alta concentração ($\sim 10^8$ ufc/ml). Para isso, foi necessário um maior tempo de enriquecimento da população bacteriana, que passou para 72 horas, uma vez que 48 h não foi tempo suficiente para o crescimento da bactéria a partir de uma suspensão pouco concentrada, de forma a detectá-la por PCR. Além disso, como consequência do aumento do tempo de enriquecimento, a lavagem das placas teve que ser realizada com 2 ml de água destilada estéril devido ao grande crescimento microbiano nas placas. Esse aumento de colônias microbianas resultou também na necessidade de diluir os lavados em 1:100, porque a amplificação é geralmente inibida quando há uma alta concentração de células.

Considerando-se todos os experimentos de Bio-PCR (Tabela 2), 96,6% das 30 amostras inoculadas a 10^8 ufc/ml foram amplificadas com sucesso, utilizando o par de *primers* Xcv1F/Xcv3R e diluições de 1:10. Entretanto, apenas 7,4% das amostras a 10^3 ufc/ml foram positivas com as mesmas condições citadas anteriormente. Para diluições 1:100, a única amostra de 10^8 ufc/ml testada foi amplificada e 55,5% das 9 amostras a 10^3 ufc/ml também apresentaram resultado positivo. Com o outro par de *primers* (RST2/Xcv3R) e diluições de 1:10, a amplificação foi positiva em 88,8% das amostras a 10^8 ufc/ml e em 5,5% das a amostras inoculadas com 10^3 ufc/ml, considerando que este par de *primers* foi utilizado para um número menor de amostras.

Com a PCR direta, o uso de apenas um ciclo com os iniciadores Xcv1F/Xcv3R não apresentou resultados positivos. Com o par RST2/Xcv3R 46,1% das amostras a 10^8 ufc/ml foram positivas, mas nenhuma amostra a 10^3 ufc/ml foi amplificada. O uso da Nested-PCR foi o que apresentou melhor resultado, amplificando 51,6% dentre as 31 amostras de 10^3 ufc/ml, 2 amostras entre 4 de 10^4 ufc/ml e 10^6 ufc/ml, 1 amostra de um total de 4 de 10^7 ufc/ml e 94,7% das 19 amostras inoculadas com uma suspensão a 10^8 ufc/ml.

A detecção de *X.c.* pv. *viticola* foi possível também através da PCR feita diretamente do lavado dos frutos, em cachos inoculados com uma suspensão de até 10^3 ufc/ml de concentração, por meio da Nested-PCR. Esse método mostrou-se mais eficiente que a

detecção por Bio-PCR, tendo em vista os resultados apresentados nos experimentos realizados e o tempo gasto até a obtenção dos resultados. São necessários, no mínimo, quatro dias para que sejam obtidos os resultados da Bio-PCR, enquanto que para a PCR direta, por meio da Nested-PCR, são necessários no mínimo 2. Numa possível situação de aplicação desse método para avaliar cachos de uvas com suspeita de contaminação com o agente do cancro bacteriano, seriam necessários 3 dias para obtenção do resultado com Bio-PCR e apenas 1 dia com a Nested-PCR direta. A Bio-PCR, no entanto, detecta apenas células viáveis (que cresceram no meio de cultura), enquanto a PCR direta pode detectar DNA proveniente de células mortas ou mesmo DNA livre, o que não teria nenhum impacto quanto à disseminação da bactéria através de cachos e frutos.

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

Experimento 1				
Amostra Concentração (ufc/ml)		Bio-PCR - Xcv1F/Xcv3R		
10 ⁸		9 ^a /9 ^b		
Experimento 2				
Amostra Concentração (ufc/ml)	Bio-PCR		PCR-Direta	
	Xcv1F/Xcv3R	RST2/Xcv3R	RST2/Xcv3R	Nested-PCR
10 ³	0 / 9	1 / 9	0 / 9	9 / 9
10 ⁸	8 / 9	7 / 9	6 / 9	9 / 9
Experimento 3				
Amostra Concentração (ufc/ml)	Bio-PCR		PCR-Direta	
	Xcv1F/Xcv3R	RST2/Xcv3R	Xcv1F/Xcv3R	Nested-PCR
10 ³	0 / 9	0 / 9	0 / 9	1 / 9
10 ⁸	9 / 9	9 / 9	0 / 3	3 / 3
Experimento 4				
Amostra Concentração (ufc/ml)	Bio-PCR - Xcv1F/Xcv3R		PCR-Direta	
	Diluição 1:10	Diluição 1:100	Xcv1F/Xcv3R	Nested-PCR
10 ³	2 / 9	5 / 9	0 / 9	4 / 9
10 ⁸	3 / 3	1 / 1	0 / 3	2 / 3
Experimento 5				
Amostra Concentração (ufc/ml)	PCR-Direta Nested-PCR			
	1º Ciclo RST2/Xcv3R	2º Ciclo Xcv1F/Xcv3R		
10 ²	0 / 4	0 / 4		
10 ³	0 / 4	2 / 4		
10 ⁴	0 / 4	2 / 4		
10 ⁵	0 / 4	0 / 4		
10 ⁶	0 / 4	2 / 4		
10 ⁷	0 / 4	1 / 4		
10 ⁸	0 / 4	4 / 4		

^a Número de amostras positivas por PCR / ^b Número de amostras processadas.

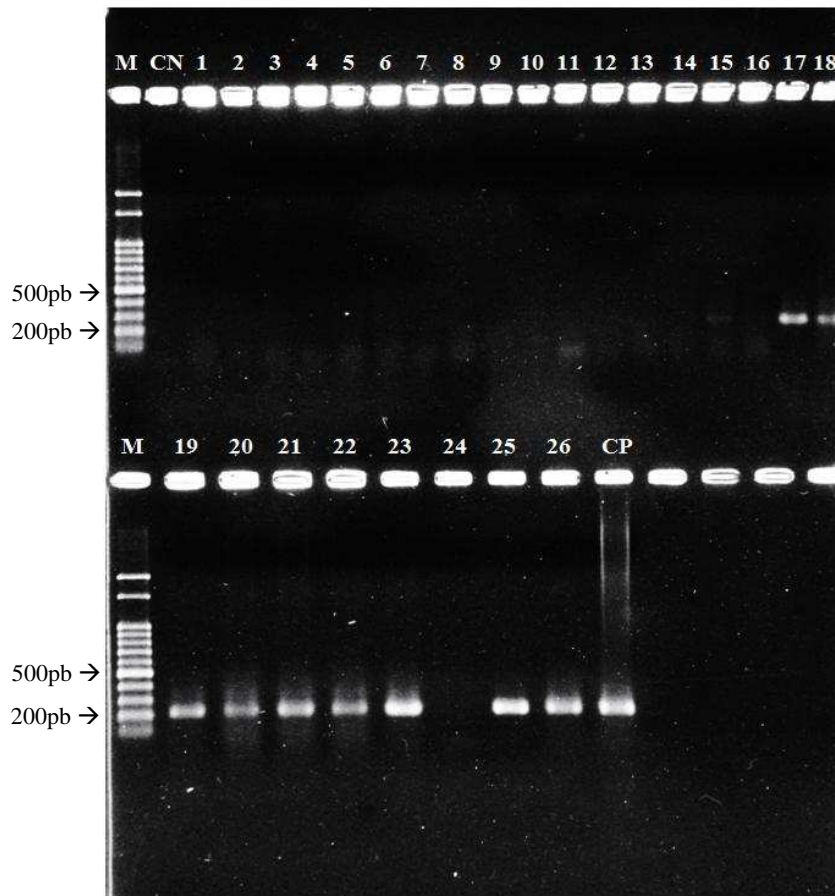


FIGURA 4. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da Bio-PCR de cachos de videira inoculados artificialmente com três diferentes tratamentos: água, suspensão a 10^3 ufc/ml e suspensão a 10^8 ufc/ml, utilizando o par de iniciadores Xcv1F/Xcv3R. M – Marcador 100pb DNA Ladder (Ludwig - Biotec); CN – Controle Negativo – água; 1 a 4 – amostras inoculadas com água; 5 a 13 – amostras inoculadas com suspensão a 10^3 ufc/ml; 14 a 22 – amostras inoculadas com suspensão a 10^8 ufc/ml; 23 – Suspensão do crescimento bacteriano em meio de cultura do isolado A-2 após 72 horas; 24 – Suspensão a 10^3 ufc/ml (isolado A-2), utilizada para inoculação nos frutos; 25 – Suspensão a 10^8 ufc/ml (isolado A-2), utilizada para pulverização nos frutos; 26 – Suspensão do crescimento bacteriano em meio de cultura da suspensão 10^8 ufc/ml (isolado A-2) após 48 horas e CP – Controle Positivo (DNA purificado do isolado A-2).

5. CONCLUSÃO

1. A partir dos ensaios realizados, pode-se concluir que é possível detectar *X.c. pv. viticola* em frutos assintomáticos que possuem uma população bacteriana residente em sua superfície, por meio de Bio-PCR ou diretamente por Nested-PCR.
2. Os experimentos demonstraram que, para que seja realizada a detecção molecular de *X.c. pv. viticola* em cachos inoculados com uma população bacteriana baixa (suspensão a $\sim 10^3$ ufc/ml) com apenas uma rodada de PCR, é necessária uma etapa de enriquecimento da população bacteriana por 72 horas. Mesmo assim, não se detectou a bactéria em 100% das repetições.
3. Em relação ao tempo necessário para obtenção dos resultados (presença ou não do patógeno) a PCR direta com 2 rodadas (Nested-PCR) é o método mais rápido, no entanto, pode detectar células mortas ou DNA livre, o que não é possível com a Bio-PCR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, J.S.P.; ROBBS, C.F.; MACIEL, G.F. Incidência do Cancro Bacteriano da Videira na Estação Chuvosa do Submédio São Francisco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 32., 1999, Fortaleza. **Resumos...** Curitiba: Fitopatologia Brasileira, 1999, v.24 (Suplemento), p.246.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 9, de 20 de abril de 2006. **Diário Oficial da União**, 26 abr. 2006. Seção 1, Página 1.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 41, de 1 de julho de 2008. **Diário Oficial da União**, 10 jul. 2008. Seção 1.

FREIRE, F.C.O.; OLIVEIRA, A.D.S. **Comunicado Técnico 62: Ocorrência do Cancro-Bacteriano da Videira no Estado do Ceará**. Fortaleza: Embrapa, 2001.

HALFELD-VIEIRA, B.A.; NECHET, K.L. Bacterial Canker of Grapevine in Roraima, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Boa Vista, v.31, n.6, p.604-604, nov./dez. 2006.

HALFELD-VIEIRA, B.A.; NECHET, K.L. **Doenças da Videira no Estado de Roraima**. Documento 04, Boa Vista: Embrapa, 2008.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **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., fev. 2011.

JUNQUEIRA, N.T.V.; JUNQUEIRA, K.P.; BRAGA, M.F.; VAZ, C.F.; SANTOS, E.C.; JUNQUEIRA, L.P.; SOUZA, L.S.; LIMA, C.A. Ocorrência do Cancro Bacteriano da Videira na Região do Entorno do Distrito Federal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 19., 2006, Cabo Frio. Frutas do Brasil: Saúde para o Mundo. **Palestras e Resumos...** Cabo Frio-RJ: SBF/UENF/UFRural RJ, 2006, p.323.

KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective Media for Isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopatology**, Davis, v.60, n.6, p.969-976, jun. 1970.

LIMA, M.F.; FERREIRA, M.A.S.V.; MOREIRA, W.A.; DIANESE, J.C. Bacterial Canker of Grapevine in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, n.3, p.440-443, 1999.

LIMA, M.F. **Cancro Bacteriano da Videira, Causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola***: Epidemiologia e Manejo. Circular Técnica, n.54. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2000.

MALAVOLTA JUNIOR, V.A.; ALMEIDA, I.M.G.; SUGIMORI, M.H.; RIBEIRO, I.J.A.; RODRIGUES NETO, J.; PIRES, E.J.P.; NOGUEIRA, E.M.C. Ocorrência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em Videiras no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v.25, n.3, p. 262-264, 1999a.

MALAVOLTA JUNIOR, V.A.; ALMEIDA, I.M.G.; SUGIMORI, M.H.; RIBEIRO, I.J.A.; RODRIGUES NETO, J.; PIRES, E.J.P.; NOGUEIRA, E.M.C. *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em Videira no Estado do Piauí. **Summa Phytopathologica**, v.25, n.1, 1999b.

MALAVOLTA JUNIOR, V.A.; SUGIMORI, M.H.; ALMEIDA, I.M.G.; RIBEIRO, I.J.A. Resistência de Variedades de Videira a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.70, n.3, p.373-376, jul./set. 2003.

MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B.; ASSIS, S.M.P.; GOMES, A.M.A.; OLIVEIRA, I.S.; NASCIMENTO, A.R.P. Diagnose e Manejo de Fitobacterioses de Importância no Nordeste Brasileiro. MICHEREFF, S.J.; BARROS, R. **Proteção de Plantas na Agricultura Sustentável**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2001. 368p.

MARQUES, E. **Variabilidade e Tolerância ao Cobre em *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, Agente Causal do Cancro Bacteriano da Videira (*Vitis* spp.)**. 2007. 129f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

MARQUES, E.; UESUGI, C.H.; FERREIRA, M.A.S.V. Sensitivity to Copper in *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.34, n.6, p.406-411, nov./dez. 2009.

MELLO, L.M.R. **Viticultura brasileira: panorama 2010**. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/prodvit2010.pdf>>. Acesso em: 04 maio 2011. 2010.

NASCIMENTO, A.R.P.; MASHIMA, C.H.; LIMA, M.F. **Cancro Bacteriano: Nova Doença da Videira no Submédio São Francisco**. Circular Técnica, n.58. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2000.

NAYUDU, M.V. *Pseudomonas viticola* sp. nov., Incitant of a New Bacterial Disease of Grapevine. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.73, p. 183-186, 1972.

OLIVEIRA, J.E.M.; LOPES, P.R.C; HAJI, F.N.P.; MOREIRA, A.N.; MIRANDA, J.R. Produção integrada de uva no Vale do São Francisco. In: ZAMBOLIM, L.; NASSER, L.C.B.; ANDRIGUETO, J.R.; TEIXEIRA, J.M.; FACHINELLO, J.C.; KOSOSKI, A. (Org.). **Produção Integrada no Brasil**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), 2008/2009. p.913-934.

PEARSON, R.C.; GOHEEN, A.C. (Org.) **Compendium of Grape Diseases**. 4. ed. St. Paul: APS Press, 1998.

PEIXOTO, A.R.; MARIANO, R.L.R.; VIANA, I.O. Meio Semi-Seletivo para Isolamento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p.1317-1320, maio/jun. 2006.

PEIXOTO, A.R.; MARIANO, R.L.R.; MOREIRA, J.O.T.; VIANA, I.O. Hospedeiros Alternativos de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira**, Recife, v.32, n.2, p.161-164, mar./abr. 2007.

SILVA, A.M.F. **Limpeza Clonal de Videira com Cancro-Bacteriano e Sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em Tecidos Infectados**. 2009. 90 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

SILVA, P. C. G; CORREIA, R. C. Caracterização social e econômica da videira. In: LEÃO, P. C.S.; SOARES, J. M. (Org.). **A viticultura no semi-árido brasileiro**. Petrolina: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), 2000. p.19-44.

TRINDADE, L.C. **Diagnose Molecular do Cancro Bacteriano da Videira Causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola***. 2007. 184 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

TRINDADE, L.C.; MARQUES, E.; LOPES, D.B.; FERREIRA, M.A.S.V. Development of a Molecular Method for Detection and Identification of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.1, p.16-23, 2007.

ANEXOS

ANEXO I

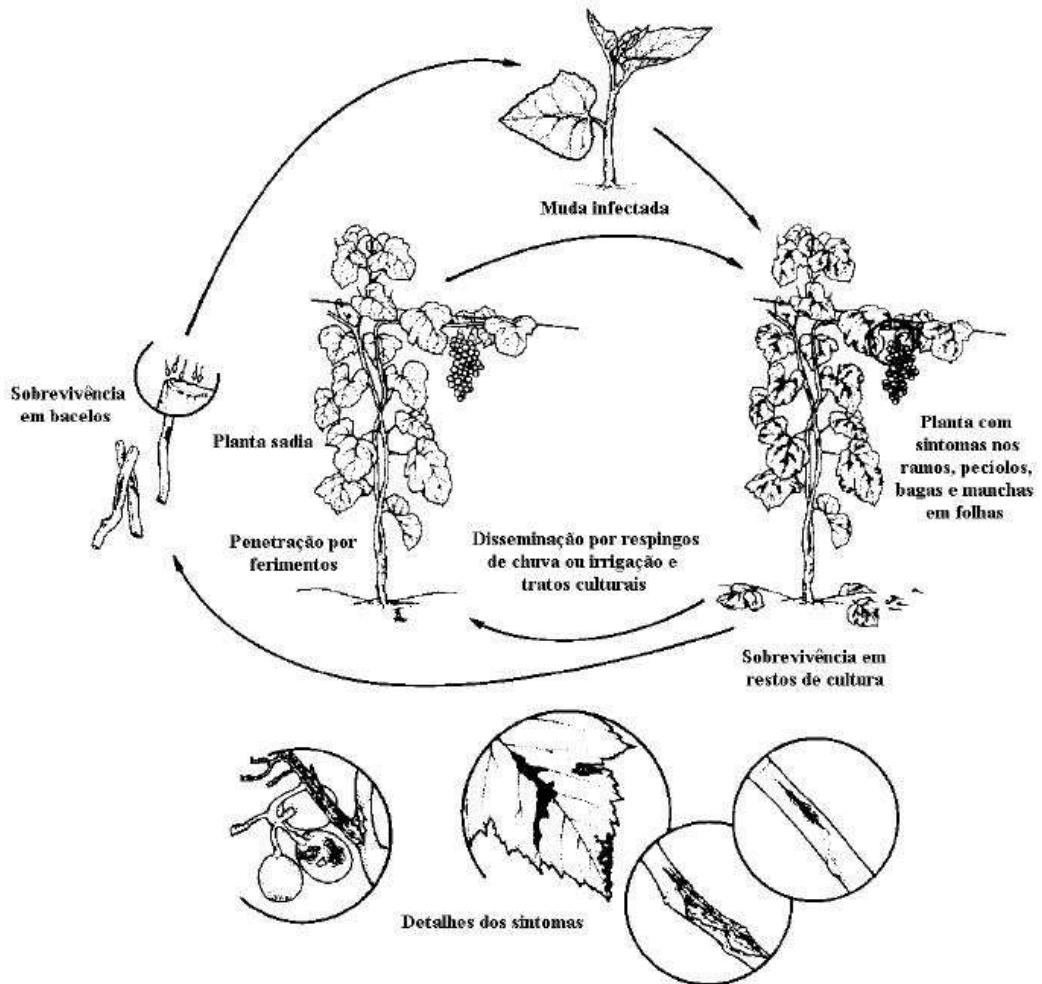


FIGURA 5. Ciclo do cancro bacteriano da videira causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, retirado de Mariano et al. (2001).

ANEXO II

TABELA 3. Relação de cultivares de videira e seus respectivos graus de suscetibilidade à *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*.

Cultivar	Espécie	Grau de Suscetibilidade
Red Globe	(<i>V. vinifera</i>)	alto
Thompson	(<i>V. vinifera</i>)	médio
Benitaka	(<i>V. vinifera</i>)	médio
Festival	(<i>V. vinifera</i>)	médio
Sonaka	(<i>V. vinifera</i>)	médio
Itália	(<i>V. vinifera</i>)	médio
Rubi	(<i>V. vinifera</i>)	médio
Niagara Rosada	(<i>V. labrusca</i> x <i>V. vinifera</i>)	baixo
Niagara Branca	(<i>V. labrusca</i> x <i>V. vinifera</i>)	baixo
Princês	(Híbrido de <i>V. vinifera</i> x ?)	baixo

Adaptado de: BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instrução Normativa nº 9, de 20 de abril de 2006.