

**UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

DISSERTAÇÃO

**CONTRIBUIÇÕES AO ESTUDO BIOQUÍMICO
MOLECULAR E EPIDEMIOLÓGICO DE *Xanthomonas*
campestris pv. *viticola* E IMPLICAÇÕES NO
PATOSSISTEMA DO CANCRO BACTERIANO DA
VIDEIRA**

Guilherme de Oliveira Tostes

2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**CONTRIBUIÇÕES AO ESTUDO BIOQUÍMICO
MOLECULAR E EPIDEMIOLÓGICO DE *Xanthomonas*
campestris pv. *viticola* E IMPLICAÇÕES NO
PATOSSISTEMA DO CANCRO BACTERIANO DA
VIDEIRA**

GUILHERME DE OLIVEIRA TOSTES

Sob a Orientação do Professor
João Sebastião de Paula Araujo
UFRRJ

Co-orientação do Professor
Fábio Lopes Olivares
UENF

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Fitotecnia, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, Área de Concentração Fitossanidade.

Seropédica, RJ
Março de 2012

634.8
T716c
T

Tostes, Guilherme de Oliveira, 1983-
Contribuições ao estudo bioquímico
molecular e epidemiológico de *Xanthomonas*
campestris pv. *viticola* e implicações no
patossistema do cancro bacteriano da
videira / Guilherme de Oliveira Tostes -
2012.

94 f. : il.

Orientador: João Sebastião de Paula
Araujo.

Dissertação (mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de
Pós-Graduação em Fitotecnia.

Bibliografia: f. 66-74.

1. Uva - Cultivo - Teses. 2.
Xanthomonas campestris - Propagação -
Teses. 3. Fitotecnia - Teses. I. Araujo,
João Sebastião de Paula, 1969-. II.
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em
Fitotecnia. III. Título.

Bibliotecário: _____

Data: ___/___/___

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

GUILHERME DE OLIVEIRA TOSTES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Fitotecnia, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, Área de Concentração Fitossanidade.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 23/03/2012.

João Sebastião de Paula Araujo (Dr.) - UFRRJ
(Orientador)

Dra. Maria Angélica Guimarães Barbosa (Dra.) - EMBRAPA SEMIÁRIDO

Dr. Marco Antonio Vasconcellos (Dr.) - UFRRJ

*A minha noiva Daiana Barros, a minha irmã Juliana de Oliveira Tostes,
aos meus familiares, amigos e professores,
pelo incessante apoio
Dedico.*

*Em memória da minha querida mãe Geny Batista de Oliveira Tostes
Ao meu pai José de Oliveira Tostes,
Com carinho
Ofereço.*

É fascinante olhar para trás e lembrar os primeiros passos na vida.

Hoje ver o quanto caminhei,

E por fim imaginar o quanto falta para completar a missão.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, em primeiro lugar, por ter me dado saúde e a oportunidade de estudar na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, e conhecer todas as pessoas que me ajudaram fazer minha vida tão feliz.

Aos meus pais, em especial à memória da minha querida mãe Dona Geny pelo incentivo e ensinamentos que foram alicerces para que eu chegasse até esse momento e que ainda dão forças para lutar pelos meus sonhos.

A minha noiva, futura esposa e eterna companheira Daiana dos Reis Barros, por todo amor e compreensão.

Ao meu amigo, orientador e incentivador Professor João Sebastião de Paula Araujo pela amizade, ensinamentos durante todos esses anos.

Ao grande irmão Antônio Roberto Gomes de Farias “Tinho” por toda ajuda e dedicação na execução deste trabalho.

Aos antigos membros do Fitolab, Maruzanete Pereira de Melo (UFLA), Maysa Souza Arêas (UNESP), Luciene Souza Ferreira (UENF) e Karin da Silva Gonçalves, e aos atuais, pois foram grandes incentivadores.

Ao grande Mestre Professor Fabio Olivares (UENF) e Daniela Frade, por todos ensinamentos e ajuda.

Aos amigos de Campos Goytacazes, Roberto e Jaídson pela acolhida durante o período de realização deste trabalho na (UENF).

Ao amigo que me fazia sorrir, mesmo quando a Lei de Murphy era implacável, Geraldo Baeta (Embrapa Agrobiológica), por toda atenção e orientação.

A pessoa que tem o dom de acalmar corações e ajudar a todos Dra. Márcia Vidal e todos membros do seu laboratório de Bioquímica (Embrapa Agrobiológica).

Aos Amigos do laboratório de Ecologia Microbiana (Embrapa Agrobiológica), Anelise, Jackson, Claudinha e Elson Barbosa.

Aos parceiros da Embrapa Semiárido por todo apoio.

Aos membros do laboratório de Química da Rizosfera (UFRRJ), por toda ajuda.

A todos, professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, pelos ensinamentos e compreensão.

Aos amigos da Turma 2010-I do PPGF por caminharmos juntos durante tantos momentos.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite para nos ajudar nos desfechos finais deste trabalho;

E por fim, a todos que contribuíram de alguma forma com esse trabalho.

RESUMO GERAL

TOSTES, Guilherme de Oliveira. **Contribuições ao estudo bioquímico molecular e epidemiológico de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e implicações no patossistema do cancro bacteriano da videira.** 2012. 94 páginas. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia com ênfase Fitossanidade). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

A videira (*Vitis* spp.) possui importância histórica, pois sempre esteve presente no cotidiano das civilizações. Por muito tempo foi considerada de clima temperado, mas hoje é cultivada nas mais variadas regiões e apresenta notória importância econômica. No Brasil, a viticultura é praticada desde o sul até o nordeste, sendo o último representado principalmente pelo Vale do Submédio do São Francisco devido às condições climáticas desta região associada ao manejo agrônomo, tornou-se excelente região produtora de uva e, a cada dia, destaca-se no cenário mundial pelos altos rendimentos e qualidade da uva produzida. Todavia a intensificação do cultivo de videira e principalmente o plantio de variedades suscetíveis na região propiciou o surgimento de problemas fitossanitários, dos quais se destaca o Cancro Bacteriano da Videira cujo agente etiológico é a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (*Xcvi*). O primeiro relato desta fitomoléstia no Brasil ocorreu em março de 1998 na região semiárida nordestina e após quatorze anos a introdução do cancro no país, a bacteriose já foi relatada em diferentes estados brasileiros, evidenciando seu potencial disseminativo e devido a isso é classificada como praga quarentenária presente pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Alguns estudos já foram realizados a cerca desse patógeno e de seu patossistema, bem como possíveis métodos de controle, porém, até o presente momento a taxonomia de *Xcvi* é indefinida, e não há registros de defensivos agrícolas específicos para o controle químico deste patógeno. Diante disso este trabalho teve por objetivo contribuir nos estudos de sua identificação e na compreensão das interações patógeno-hospedeiro, bem como avaliar *in vitro* os efeitos de agroquímicos sob estirpes de *Xcvi* isoladas em diferentes anos na meso região onde ocorreram os primeiros relatos desta doença. Para tal, foram realizadas coletas de material vegetal *in situ*, isolamentos e caracterização das estirpes utilizadas. O estudo resultou no primeiro depósito de sequências de 16S rDNA *Xcvi* no Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI) e identificou de forma pioneira a presença de *Xcvi* em sementes de bagas assintomáticas de videira sendo esse mais um nicho de sobrevivência do patógeno. Paralelamente, os ensaios *in vitro* indicaram o aparecimento de estirpes resistentes aos principais bactericidas empregados no manejo do cancro bacteriano da videira, o que pode indicar um processo de co-evolução.

Palavras-chave: viticultura; *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*; disseminação; sobrevivência; resistência.

GENERAL ABSTRACT

TOSTES, Guilherme de Oliveira. **Contributions to molecular and epidemiological study of biochemical *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* pathosystem and implications for canker of the vine bacterial.** 2012. 94 pages. Dissertation (Master of Science in Crop Science/Plant Pathology). Agronomy Institute, Crop Science Department, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

The grapevine (*Vitis* spp.) has historical relevance due to its presence in the lives of several civilizations. For a long time it was considered as a temperate climate crop, however, it is nowadays cultivated in various regions and climates with notorious economic importance. In Brazil, viticulture is practiced from the South to the Northeast region, the latter being mainly represented by the Valley of the Northeast of San Francisco River. This area has become an excellent grape growing region, due in part to the favorable climatic conditions as well as to the technologically advanced agronomic management. As a result, this region stands out worldwide by its high yields and quality of grapes. However, the intensification of a vineyard and especially the use of susceptible varieties in the region has given rise to disease problems, with emphasis to the bacterial canker of grapevine which etiological agent is the bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (*Xcvi*). The first report of this disease in Brazil took place in the Northeastern semiarid region in March 1998, and fourteen years it has been reported in other Brazilian states, which shows its spreading potential. It has then considered as a quarantine disease by the Brazilian Ministry of Agriculture. Some studies have already been made on this pathogen and its pathosystem, as well as on control methods. However, the taxonomy of *Xcvi* is still undefined. No records of specific pesticides to chemically control this pathogen have been found. The objective of this research was to identify and to understand *Xcvi*/grapevine host-pathogen interactions and to evaluate the effects of agrochemicals on *Xcvi* strains *in vitro*, isolated in the Brazilian semiarid region in different years. Samplings from plant material were taken *in situ* followed by isolation and molecular characterization of strains. The study resulted in a first storage of 16S rDNA sequences for *Xcvi* in the National Center for Biotechnology Information (NCBI). Also, the presence of *Xcvi* in seeds of asymptomatic berries vine as a survival niche to the pathogen was established for the first time. In addition, the *in vitro* assays showed *Xcvi* strains resistant to the main antibacterial used for the management of grapevine bacterial canker, which may indicate a co evolution process.

Key words: viticulture; bacterial canker of grapevine; dissemination; survival; resistance.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
1 - REVISÃO DE LITERATURA	2
1.1 - Características botânicas da videira	2
1.2 - Histórico da videira.....	2
1.3 - A viticultura no mundo.....	3
1.4 - A viticultura no Brasil.....	4
1.5 - O Vale do São Francisco e a viticultura.....	5
1.6 - Sintomas ocasionados pela bacteriose	6
1.7 - Cancro bacteriano da videira: origem, disseminação e panorama atual.....	8
CAPÍTULO I: TÉCNICAS CLÁSSICAS E MODERNAS NA IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA DE <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i>	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1 - INTRODUÇÃO	14
2 - MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1 - Coleta de material e obtenção de isolados	15
2.2 - Teste de patogenicidade.....	17
2.3 - Caracterização morfológica das colônias	17
2.4 - Caracterização bioquímica.....	18
2.6 - Caracterização molecular	18
2.6.1 - Extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) total.....	18
2.6.2 - Amplificação do 16S rDNA.....	19
2.6.3 - Sequenciamento do produto de amplificação DA 16S DNAr.....	19
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4 - CONCLUSÕES.....	28
CAPÍTULO II: NICHOS DE SOBREVIVÊNCIA DE <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> EM TECIDOS DE BAGAS E SEMENTES DE VIDEIRA	29
RESUMO	30
ABSTRACT	31
1 - INTRODUÇÃO.....	32
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2.1 - Preparo de amostras para microscopia ótica.....	34
2.2 - Preparo de amostras para microscopia eletrônica de varredura.....	34
2.3-Validação do anticorpo AC 4558, para posterior utilização na imunomarcação.....	35
2.4 - Imunomarcação com partículas de ouro para microscopia ótica.....	36
2.5 - Potencial de disseminação de <i>Xcvi</i> através dos frutos.....	36
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4 - CONCLUSÕES.....	47
CAPÍTULO III: EVOLUÇÃO DA RESISTÊNCIA DE <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> AOS PRINCIPAIS AGROQUÍMICOS EMPREGADOS NO MANEJO DO CANCRO BACTERIANO DA VIDEIRA.....	48
RESUMO.....	49
ABSTRACT.....	50
1 - INTRODUÇÃO.....	51
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	53

2.1 - Coletânea de estirpes utilizadas.....	53
2.2 - Teste de Patogenicidade.....	54
2.3 - Ensaio de resistência <i>in vitro</i> aos agroquímicos.....	55
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
4 - CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
ANEXOS.....	75

LISTA DE TABELAS

1 - Estados brasileiros que apresentaram maior produtividade de uvas por área plantada no ano de 2011 (Fonte: IBGE, 2012).....	5
2 - Código, ano, local e variedades de origem das estirpes de <i>Xcvi</i> que tiveram o DNA extraído.....	20
3 - Isolados de <i>Xcvi</i> obtidos das coletas <i>in situ</i> com respectivas variedades e codificação.....	21
4 - Ano e local de coleta dos materiais onde foram isoladas as estirpes de <i>Xcvi</i> , avaliadas quanto à resistência.....	53

LISTA DE FIGURAS

- 1 - Comportamento produtivo da viticultura mundial nas últimas décadas, elaborado através de dados da FAO, (2012)..... 4
- 2 - A) Pontos necróticos nas folhas; B) Bagas apodrecidas, da variedade Red Globe; C) Mancha foliar necrótica; D) Formação de cancos no caule; E) Cancro em ramos novos; F) Murcha de bagas e necrose do engaço da variedade Thompson seedles..... 7
- 3 - Disseminação do cancro bacteriano da videira, ordem cronológica de relatos em diferentes estados brasileiros..... 9
- 4 - Panorama atual, dos estados brasileiros onde já ocorreram relatos do cancro bacteriano da videira..... 10
- 5 - Área produtora comercial de uva finas para mesa *Vitis vinifera*, onde se procederam coletas *in situ* A) Parreiral plantado com a variedade Red Globe; B) Detalhe de folhas manifestando bordas com manchas necróticas; C) Acondicionamento de amostras coletadas: folhas em embalagem plástica hermética, tubos rosqueados contendo gavinhas e caixa de papelão para transporte de bagas da variedade Itália; D) Sintomas da expressão do cancro em cacho de uva da variedade Red Globe, evidenciando prejuízo a produtividade da videira..... 16
- 6 - Características morfológicas desenvolvidas por estirpes de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (*Xcvi*) comparadas com *Bacillus* sp. A) Desenvolvimento de *Xcvi* em meio NA após 48h/28°C. B) Desenvolvimento de colônias de *Bacillus* sp., oportunista frequente em tentativas de isolamento *in vitro* de *Xcvi*, C) Detalhe de colônias evidenciando padrão de brilho, transparência e elevação típicas de colônias de *Xcvi*. D) Contraste das mesmas características descritas em C, desenvolvidas por colônias de *Bacillus* sp., E) Imagem ao microscópico ótico da borda lisa típica de colônias de *Xcvi* quando comparada com borda irregular de colônia de *Bacillus* sp (F)..... 22
- 7 - Comparação de algumas características morfológicas de contrastadas *Xcvi* com aquelas desenvolvidas por *Xcm*, quando crescidas em BDA, após 72 horas de incubação. A) Notar menor produção de muco (seta) por *Xcvi* que por *Xcm* (B); C) Halo resultante da hidrólise de amido produzido por colônias de *Xcvi* em placa de petri, comparativamente menor frente ao halo mostrado em (D), produzido por *Xcm*; E) Detalhe de contraste obtido com adição do corante azul de algodão sobre meio de cultivo das duas espécies bacterianas. Observar (seta) menor formação de halo em *Xcvi* do que em *Xcm* (F)..... 23
- 8 - Avaliação do teste bioquímico API 20NE, após 24 horas. Observar similaridade entre padrões de respostas desenvolvidos nos substratos do Kit, provocados por estirpes de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (A), *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* (B) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalyptos* (C)..... 24

9 - Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de amplificação das regiões 16S de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> . Notar na corrida do gel, similaridade de retenção e posicionamento das bandas de 16S rDNA.....	26
10 - Árvore filogenética construída com sequências do gene DNAr 16S (1.420 pb) oriundas de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> e de sequências obtidas no National Center For Biotechnology Information (NCBI) de outras espécies de <i>Xanthomonas</i> . O método utilizado foi <i>Neighbor-Joining</i> e modelo <i>Maximum Composite Likelihood</i> no programa Mega 4.1. Análise de <i>Bootstrap</i> com 1000 réplicas.....	27
11 - Amostras de uvas de variedades e origens diversas, coletadas em pontos de venda no Rio de Janeiro.....	37
12 - Cidades de origem das bagas de videiras coletados em comércio varejista do Estado do Rio de Janeiro e submetidos a tentativas de isolamento de <i>Xcvi</i>	38
13 - A e B) Fotomicrografias de engaço ligado a baga de uva da variedade Red Globe apresentando degeneração do tecido ocasionado por <i>Xcvi</i> ; C e D) <i>Xcvi</i> aderida ao tecido epitelial do engaço.....	39
14 - A) Fotomicrografias de semente de uva variedade Red Globe apresentando sintomas de cancro e desprendimento do tecido epitelial; B) Desorganização celular e comprometimento do tecido externo da semente; C) e D) Massas de células bacterianas colonizando extensa área do tecido lesionado promovendo intensa infecção; E) e F) Notar massa formada por células baciliformes característica morfológica de <i>Xcvi</i>	40
15 - Fotomicrografias de semente de uva variedade Red Globe assintomáticas; A e B) Evidencia a ausência de sintomas; C e D) Elo de ligação da semente com pecíolo; E e F) Células de <i>Xcvi</i> promovendo intensa colonização na cavidade interna de semente onde se fixa o pecíolo, indicando a característica sistêmica desta bactéria; G e H) Sintomas iniciais de degeneração celular do tecido.....	41
16 - Avaliação da efetividade do anticorpo policlonal AC 4558 frente a diferentes estirpes de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> (ENA 4562, 4598 e 4600) e a <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> (ENA 4480) pelo método Elisa, através do teste Tukey a nível de 5% de probabilidade de erro. Letras iguais traduzem-se em não significância estatística entre as médias de leitura de densidade ótica.....	42
17 - Esquema ilustrativo da reação bioquímica de imunomarcção; B) Fotomicrografia ótica de campo claro corte longitudinal de semente de uva da variedade Red Globe, onde é possível observar a formação de precipitado negro ocasionado pela adesão das partículas de prata ao anticorpo primário. Observar exsudação (Seta) indicando células de <i>Xcvi</i> saindo da área interna ao tegumento em direção a parte externa do tegumento através de uma cavidade.....	44
18 - A e B) Fotomicrografia ótica de campo claro de corte transversal de semente assintomática de uva da variedade Red Globe, colorida com azul de tolúidina 1%,	

onde é possível notar a integridade dos tecidos; C) 1- Parênquima, 2 - Endosperma, 3 - Espaço interno entre o Endosperma e o tegumento, 4 - Tegumento; D) Detalhe do corante metacromático reagindo com células bacterianas e assumindo cor arroxeadas; F e G) Controle negativo no ensaio de imunomarcação no detalhe ausência de formação de precipitado negro local onde se aloca <i>Xcvi</i> ; H e I) Reação de imunomarcação positiva e no detalhe ponto de alocação de <i>Xcvi</i> no tecido interno da semente.....	45
19 - Percentagem de amostras de uvas de diferentes variedades oriundas do Nordeste, contaminadas com <i>Xcvi</i>	46
20 - Mesorregião onde ocorreram os primeiros relatos do cancro bacteriano da videira no Brasil e de onde foram isoladas as estirpes de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> investigadas quanto a resistência.....	54
21 - Esquema ilustrativo da metodologia de avaliação da resistência de <i>Xcvi</i> aos agroquímicos baseado em Marco & Stall (1983) e Araujo (2001).....	55
22 - Exemplos de crescimentos obtidos nos ensaios experimentais, demonstrando números de colônias bacterianas desenvolvidas e forma com que foram agrupadas em escala de notas durante avaliação da resistência de <i>Xcvi</i> aos agroquímicos estudados.....	56
23 - Infiltração de suspensão de 10^8 ufc/ml de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> em plantas de videira Red Globe, mantidas em casa de vegetação Detalhe da Face ventral (A) e Face dorsal (C) de folha de <i>Vitis vinifera</i> apresentando mesófilo foliar assintomático, controle negativo. Também notar Face ventral (B) e Face dorsal (D) da folha, manifestando sintomas no mesófilo foliar decorrente da patogenicidade de <i>Xcvi</i> . E detalhe do ponto exato da nervura (E) onde foi infiltrada solução salina 0,85% e integridade da região ao redor. De forma contrastante, notar ponto exato da nervura (D) onde foi realizada a infiltração de suspensão de <i>Xcvi</i> e necrose da região ao redor.....	57
24 - Avaliação <i>in vitro</i> do crescimento de diferentes estirpes de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> , quando expostas a concentrações de 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 1000 µg/ml dos agroquímicos sulfato de cobre (SC), mancozeb (M) e mistura (SC) + (C), através do teste Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade de erro. Letras iguais traduzem-se em não significância estatística entre as médias.	59
25 - Avaliação <i>in vitro</i> do efeito sinérgico da mistura sulfato de cobre + mancozeb na inibição do crescimento de diferentes estirpes de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> , através do teste TuKey em nível de 5% de probabilidade de erro. As letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os agroquímicos utilizados nas concentrações 0; 50; 100; 150; 200; 250; 300 e 1000µg/ml.....	62
26 - Regressão alcançada para a avaliação <i>in vitro</i> de diferentes concentrações de Sulfato de Cobre (SC), Mancozeb (M) e Mistura (SC) + (C) na erradicação ou não de diferentes estirpes de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i>	60
27 - Avaliação <i>in vitro</i> da sensibilidade de diferentes estirpes de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> quando exposta ao agroquímico sulfato de cobre através do	

teste Scott - Knott em nível de 5% de probabilidade de erro. Letras iguais traduzem-se em não significância estatística entre as médias.....	61
28 - Avaliação da sensibilidade in vitro de estirpes de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> após tratamento com mancozeb, através do teste Scott - Knott em nível de 5% de probabilidade de erro. Letras iguais traduzem-se em não significância estatística entre as médias.....	61
29 - Avaliação da sensibilidade in vitro de estirpes de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> após tratamento com sulfato de cobre + mancozeb, através do teste Scott - Knott em nível de 5% de probabilidade de erro. Letras iguais traduzem-se em não significância estatística entre as médias.....	62
30 - Estudo <i>in vitro</i> de concentrações de sulfato de cobre mais eficientes na erradicação de diferentes estirpes de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> , através do teste Scott - Knott em nível de 5% de probabilidade de erro.....	62
31 - Avaliação da sensibilidade in vitro de estirpes de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> após tratamento com mancozeb, através do teste Scott - Knott em nível de 5% de probabilidade de erro. Letras iguais traduzem-se em não significância estatística entre as médias.....	63
32 - Estudo <i>in vitro</i> de concentrações de sulfato de cobre + mancozeb na inibição do crescimento de diferentes estirpes de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> , através do teste Scott - Knott em nível de 5% de probabilidade de erro. Letras iguais traduzem-se em não significância estatística entre as médias.....	63
33 - Variação do potencial hidrogeniônico (pH) das caldas de Mancozeb, Sulfato de Cobre e da mistura dos dois agroquímicos em temperatura de 27 °C.....	64

INTRODUÇÃO GERAL

A videira (*Vitis* spp) é um arbusto com caule sarmentoso e trepador, que se fixa a suportes naturais ou artificiais, pertencente à família Vitaceae e presente desde a antiguidade no cotidiano das populações. Hoje é cultivada em diferentes países, graças a sua plasticidade que permite adaptação com produção satisfatória em áreas de clima sub-tropical ou mesmo semiárido. Nos últimos anos a viticultura vem ganhando espaço no cenário econômico brasileiro (FAO, 2012), tanto em função do substancial aumento da produção de vinho, como atendendo a demanda da fruta fresca no mercado interno e externo.

Considerada como planta adaptada a regiões de clima temperado, pelo fato de ter folhas decíduas, atualmente tem seu cultivo em diversas condições climáticas, incluindo regiões que anteriormente eram consideradas climaticamente inaptas, tais como o Vale do Submédio do São Francisco, na Bahia em Pernambuco, que com o emprego da irrigação e diferentes técnicas de manejo agrônomicas tornou-se, excelente produtora de uva (PEDRO JÚNIOR & SENTELHAS, 2003), destacando-se pela expansão da área cultivada, volume de produção e, principalmente, pelos altos rendimentos produtivos alcançados em relação a outras regiões brasileiras (IBGE, 2012) e, ainda qualidade da uva produzida. Nessa região, a cultura da videira possui grande importância sócio-econômica pelo grande número de empregos gerados (SILVA & CORREIA, 2000).

Todavia, a intensificação do cultivo da videira, o plantio de variedades suscetíveis e condições climáticas prevalentes no Submédio São Francisco têm propiciado o surgimento de problemas fitossanitários, afetando significativamente a produção e a produtividade (TAVARES, 1995). Além disso, aquisição de mudas sem certificação (TAVARES & MENEZES, 1991) e a introdução de novas variedades oriundas de países estrangeiros, algumas vezes trazidas ao Brasil de forma clandestina, sem qualquer procedimento de quarentena e monitoramento pelo Ministério da Agricultura e Órgãos de Defesa Sanitária Vegetal dos Estados.

Notoriamente, um dos principais problemas fitossanitários que desafia produtores da região é o cancro bacteriano da videira, cujo agente causal é a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (*Xcvi*). As primeiras ocorrências foram detectadas em 1998, e já no ano seguinte a patologia foi classificada como praga quarentenária presente, através da Instrução Normativa SDA nº 38 permanecendo como tal até os dias de hoje (MAPA, 2012).

Segundo Araujo (2001), esse patógeno pode sobreviver de forma epifítica sobre a planta e em condições favoráveis colonizá-las de forma sistêmica provocando sintomas como pontos necróticos nas folhas, com ou sem halos amarelados, que algumas vezes chega a causar a morte de extensas áreas do limbo foliar. Nas nervuras e pecíolos das folhas, ramos e ráquis dos frutos formam-se manchas escuras alongadas, que evoluem para fissuras longitudinais de coloração negra, conhecidas como cancrios.

Considerando a natureza da infecção, uma das principais medidas adotada hoje é o controle químico, através de pulverizações com produtos a base de cobre, logo após as podas, brotações e sempre que há ferimentos decorrentes do manejo de cultivo. Contudo, ressalte-se que ainda não há produtos registrados para o manejo químico dessa bacteriose (MAPA, 2012) e estudos realizados por Marques et al. (2009) indicaram que populações de *Xcvi* estão adquirindo resistência a produtos cúpricos.

Passada mais de uma década a introdução do cancro bacteriano no país, diferentes autores como Malavolta et al. (1999); Freire & Oliveira, (2001); HALFED-Vieira & Nechet (2006) e Rodrigues et al. (2011) relataram novos pontos de incidência da doença em diferentes estados brasileiros indicando o potencial disseminativo deste

patógeno e traduzindo-se em maior preocupação aos viticultores e pesquisadores que se dedicam a minimizar dos prejuízos ocasionados pela doença.

Sendo assim, visando gerar conhecimentos que contribuam ao estudo de *Xcvi* e ao patossistema do cancro bacteriano da videira o presente trabalho teve como objetivos principais:

- a) Caracterização morfológica, bioquímica e molecular de isolados de *Xcvi*;
- b) Investigar nichos de colonização de *Xcvi* que favoreçam na melhor compreensão das interações patógeno-hospedeiro;
- c) Detectar possível evolução da resistência a agroquímicos de estirpes de *Xcvi* isoladas na meso região onde ocorreram os primeiros relatos do cancro bacteriano da videira no Brasil.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Características Botânicas da Videira

Pertencente à classe Magnoliopsida, subclasse Rosidae, ordem Rhamnales, família Vitaceae e gênero *Vitis* (POMMER & Maia, 2003), a videira é um arbusto perene, lenhoso, caducifólio, sarmentoso e trepador, provido de órgãos especializados utilizados na sustentação denominados de gavinhas.

Quando inexistem suportes, se estende sobre a superfície do terreno, em posição mais ou menos ereta, ocupando áreas significativas (HIDALGO, 1993). As flores são reunidas em inflorescências denominadas cachos compostos ou panículas. Os frutos da videira são bagas pedunculadas, reunidas em cachos de tamanho variável, que se apresentam compactos ou soltos, dependendo do número de bagas neles fixados (QUEIROZ-VOLTAN & PIRES, 2003).

A videira apresenta uma sucessão de ciclos vegetativos, intercalados por períodos de repouso. Nas regiões de clima bem definido, as fases do ciclo da planta acompanham as variações estacionais, com brotações ocorrendo na primavera e queda das folhas no outono. A videira cresce e se desenvolve melhor em regiões com verões longos e secos, moderadamente quentes, e com invernos frios para satisfazer as necessidades de repouso vegetativo (PEDRO JÚNIOR & SENTELHAS, 2003). Quando em clima semiárido, ou seja, em condições de altas temperaturas e baixa pluviosidade ao longo do ano, o repouso vegetativo da videira é induzido através da suspensão da irrigação e, conforme o manejo é possível se obter mais de duas safras comerciais durante o mesmo ano, fato este, que vem justificando os altos investimentos no cultivo de videiras na região do vale do sub médio São Francisco.

1.2 Histórico da Videira

O cultivo da videira é muito remoto, uma vez que vasos sagrados encontrados na antiga cidade comercial de Kannish, na Turquia, mostram que a viticultura era praticada desde a idade do bronze, há cerca de 3.500 anos a.C. (LEÃO & POSSÍDIO, 2000). Embora sejam divergentes as opiniões acerca do local exato de origem da videira, a hipótese mais aceita é que tenha surgido no período terciário, provavelmente, na atual Groenlândia e, a partir daí, dispersada em direção da América do Norte, Ásia e Eurásia (CORRÊA & BOLIANI, 2001). Da Ásia menor, a videira foi levada em direção à Síria e ao Egito. Na Grécia, alcançou extraordinário progresso, impregnando sua história, tradições e religiões. Os navegadores fenícios difundiram a videira em Roma, França e

pelo resto da Europa, atingindo o reino Português pelas Ilhas Canárias e da Madeira. (POMMER & MAIA, 2003).

Dados históricos revelam ainda, que a primeira introdução da videira no Brasil foi feita pelos colonizadores portugueses em 1532, na então capitania de São Vicente, hoje Estado de São Paulo. A partir desse ponto e através de introduções posteriores, a viticultura expandiu-se para outras regiões do país, com cultivares de *Vitis labrusca* e europeias trazidas pelos imigrantes Italianos. Hoje a videira é cultivada nas mais diversas regiões, contando com um acervo de aproximadamente 10.000 variedades distribuídas em diferentes regiões, graças à facilidade de adaptação às diversas condições ambientais (CORRÊA & BOLIANI, 2001). Entre as espécies de maior interesse econômico, pertencentes ao gênero *Vitis*, têm-se as videiras americanas (*Vitis labrusca* e outras espécies), europeias (*Vitis vinifera*), híbridas e seus mutantes (KISHINO, 2007).

1.3 A viticultura no mundo

A produção mundial de uvas apresentou um período de crescimento acelerado entre as décadas de 60 e 80, passando de 42,9 milhões de toneladas no início da década de 60 para 66,5 milhões de toneladas em 1980. No decorrer deste período observou-se a redução de área e produção nos maiores países produtores e aumento de produção em países menos tradicionais no cultivo (KISHINO, 2007). Já nos anos 90 a viticultura retomou o crescimento com aumento de área plantada e incremento na produção (Figura 1), chegando, nos dias de hoje a aproximadamente oito milhões de hectares plantados, aumento de 34,74 % de área plantada e 67,21 % de produção (FAO, 2012).

Na Europa bem como em outros continentes, vários países cultivam a videira em grandes extensões e o melhoramento da cultura é uma das mais importantes áreas de desenvolvimento tecnológico, atendida por grande número de universidades e instituições. O maior produtor mundial de uvas é a Itália, com 7,79 milhões de toneladas, seguida pela China, Estados Unidos, Espanha e França com 7,23, 6,63, 6,02 e 5,66 milhões de toneladas, respectivamente (FAO, 2012). Tais números fazem com que a videira represente cerca, de 16% do total de frutas frescas produzidas no mundo, sendo que na Europa a produção de uva chega a representar 52% do total de frutas frescas.

A produção de uvas apresenta destaque também na América do sul onde a Argentina, Chile e Brasil são os maiores produtores da fruta.

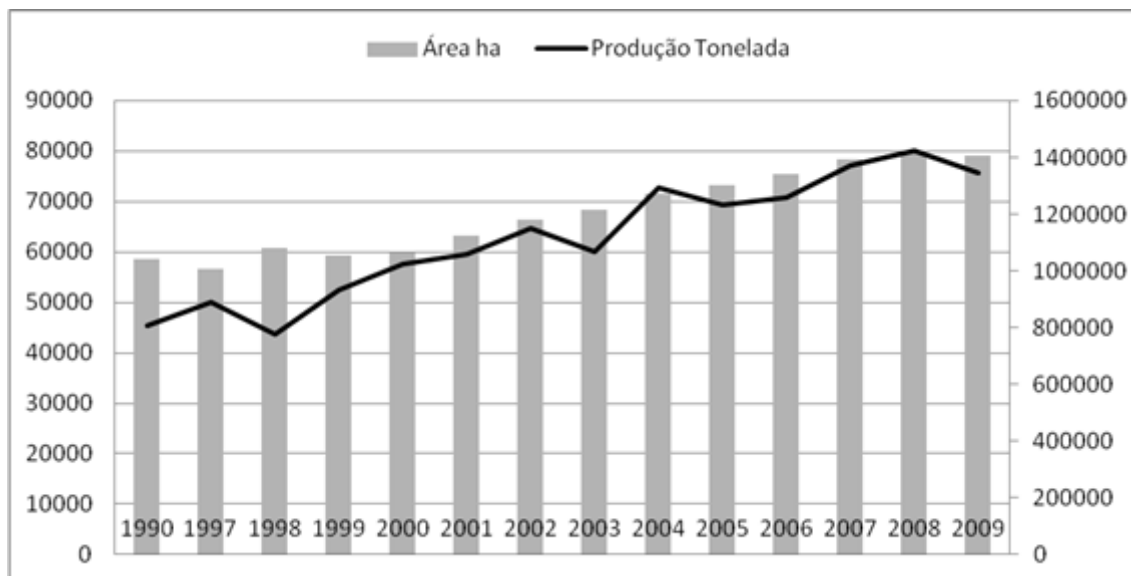


Figura 1. Comportamento produtivo da viticultura mundial nas últimas décadas, elaborado através de dados da FAO, (2012).

1.4 A viticultura no Brasil

A fruticultura assume posição de destaque na agricultura brasileira, contribuindo com 10% da produção mundial, estimada em 30 milhões de toneladas em uma área plantada de 2,3 milhões de hectares (LEÃO & BORGES, 2009).

Esse percentual torna o Brasil um dos maiores produtores de frutas do mundo. As condições brasileiras para o mercado interno, como para o mercado externo, conferem-lhe vantagens comparativas em relação aos países concorrentes devido às condições climáticas favoráveis, grande disponibilidade de área e acervo razoável de tecnologias.

Dentre as frutas produzidas no Brasil, a uva ganha importância a cada ano e atualmente o país ocupa a 15ª posição no Ranking de produtores mundiais (FAO, 2012).

A produção interna encontra-se distribuída principalmente nas Regiões Sul, Sudeste e Nordeste. Na Região Sul, maior produtora do País, a colheita destina-se em sua grande maioria à produção de vinhos, enquanto nas demais regiões produtoras, predominam a produção de uvas de mesa (*in natura*). Na Região Nordeste a produção concentra-se no Vale do São Francisco, mais precisamente entre os estados de Pernambuco e Bahia, cuja grande parte da produção é destinada ao mercado externo (LEÃO et al., 2011).

A vitivinicultura é uma atividade importante para a sustentabilidade da pequena propriedade brasileira, pois gera muitos empregos em pequenas áreas sendo uma excelente cultura para agricultores familiares. Nos últimos anos, tem se tornado importante, também, na geração de emprego em grandes empreendimentos, que produzem uvas de mesa e uvas para processamento (SILVA & CORREIA, 2000).

A atividade vinícola nas regiões tropicais do Brasil foi efetivamente desenvolvida a partir da década de 1960, com o plantio de vinhedos comerciais de uva de mesa na região do Vale do São Francisco, no Semiárido brasileiro. Nos anos 70 surgiu o pólo vitícola do Norte do Paraná e na década de 80 desenvolveram-se as regiões do Noroeste do Estado de São Paulo e Pirapora, no Norte de Minas Gerais, em sua maioria voltada à produção de uvas finas para o consumo *in natura*.

Iniciativas mais recentes, como as verificadas nas regiões Centro-Oeste (Estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás) e Nordeste (Bahia e Ceará), permitem que se projete um aumento significativo na atividade vitivinícola no país (LEÃO & POSSÍDIO, 2000).

Atualmente os maiores produtores brasileiros são os estados do Rio Grande do Sul, Pernambuco, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Bahia e Minas Gerais (Tabela 1), destacando-se os representantes do Nordeste com maior produtividade.

Em contrapartida ao notório aumento de produção da fruta nessas regiões, a ocorrência de um grande número de doenças de causas diversas afeta diretamente a produtividade e ainda são obstáculos a serem vencidos pelos viticultores brasileiros.

Tabela 1. Estados brasileiros que apresentaram maior produtividade de uvas por área plantada no ano de 2011 (Fonte: IBGE, 2012).

Estado	Área (ha)	Produção (t)	Produtividade (t/ha)
Rio Grande do Sul	49.182	829.589	16,87
Pernambuco	6.822	208.660	30,59
São Paulo	9.514	177.227	18,63
Paraná	6.000	105.000	17,5
Santa Catarina	5.009	67.767	13,53
Bahia	2.730	65.434	23,97
Minas Gerais	746	9.804	13,14

1.5 O Vale do São Francisco e a Viticultura

No Brasil, a videira é cultivada desde o extremo Sul, principalmente Rio Grande do Sul e Santa Catarina, até o Nordeste, em regiões anteriormente consideradas climaticamente inaptas. Com o emprego da irrigação a partir da década de 1960, a viticultura tropical brasileira foi efetivamente desenvolvida, com o plantio de vinhedos comerciais de uva de mesa na região do Submédio São Francisco, na Bahia e Pernambuco e em extensas áreas de Minas Gerais, tornando-se excelente região produtora de uva (PEDRO JÚNIOR & SENTELHAS, 2003), destacando-se pela expansão da área cultivada e do volume de produção e, principalmente, pelos altos rendimentos alcançados e qualidade da uva produzida (SILVA & CORREIA, 2000).

Atualmente, o plantio de parreirais na região Nordeste do país se concentra na região do Submédio do rio São Francisco, no pólo Petrolina - Juazeiro, o que faz com que o Vale do São Francisco seja o maior exportador de uva *in natura* do País. Em 2010, as exportações nordestinas representaram 99% do total brasileiro (MAPA - AGROSTAT, 2011).

O Vale do São Francisco possui uma característica ímpar na produção de uva, pelo fato de ser capaz de produzir mais de duas safras por ano devido suas condições climáticas. O repouso vegetativo, nessa região, é regulado pela época seca, e o manejo de irrigação, aliado ao clima quente, permite ao viticultor obter duas colheitas sucessivas no mesmo ano (PEDRO JÚNIOR & SENTELHAS, 2003). Esse fato tem levado investidores para essa região, fomentando a produção de uvas nas duas últimas décadas, principalmente no polo Petrolina-Juazeiro.

A região ainda se encontra em estágio de contínua expansão, e hoje se volta para investimentos na produção de cultivares de uvas apirênicas e uvas para vinhos e sucos. Todavia, com a intensificação do cultivo de videira, o plantio de variedades suscetíveis,

as condições climáticas prevalentes no Submédio São Francisco como também a aquisição de mudas sem certificação têm propiciado o surgimento de problemas fitossanitários, que afetam diretamente a produção e a produtividade nesse pólo agrícola (TAVARES, 1995). Até o final de 1997, apenas bactérias do gênero *Agrobacterium* haviam sido relatadas no país infectando videira (BERIAM et al., 1991; LACERDA et al., 1991; OLIVEIRA et al., 1994). Entretanto, no início de 1998 foi detectado, pela primeira vez no Brasil, o cancro bacteriano da videira em parreirais do Submédio São Francisco, aonde a doença vem causando prejuízos em cultivares suscetíveis (LIMA et al., 1999; MALAVOLTA et al., 1999; ARAUJO, 2001).

Tendo em vista o potencial produtivo da região para o cultivo da videira e atuais investimentos em expansões de áreas com novas variedades de uvas para elaboração de vinhos finos em regiões tropicais, como também na produção de variedades de uvas apirênicas, as investigações comportamentais dos fitopatógenos, mais especificamente da bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* vem se tornando cada vez mais imprescindível para a segurança dos novos negócios na região.

1.6 Sintomas ocasionados pela bacteriose

No Submédio do Vale São Francisco, os sintomas da bacteriose conhecida como o cancro da videira, ocorrem com mais intensidade no primeiro semestre do ano, onde há maior ocorrência de chuvas, alta umidade relativa e temperatura elevada.

Os sintomas surgem inicialmente como pontos necróticos de 1-2 mm de diâmetro, (Figura 2 - A) com ou sem halos amarelados. Nas folhas ainda é possível se observar a formação de manchas maiores (Figura 2 - C) e sua persistência na planta mesmo depois de secas. Nos pecíolos e caule ocorrem manchas necróticas e alongadas, formando deformações denominadas de cancos (Figura 2 - D e E). Nos ramos e nas ráquis, ocorre a formação de manchas necróticas alongadas, que em sua evolução provocam fissuras longitudinais de coloração negra.

A planta, além da baixa produtividade, pode expressar os sintomas também nas bagas (Figura 2 - B e F), sendo caracterizados por manchas cloróticas e necróticas circulares e desuniformes quanto a cor e tamanho (LIMA et al., 1999; Malavolta Jr. et al., 1999).

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

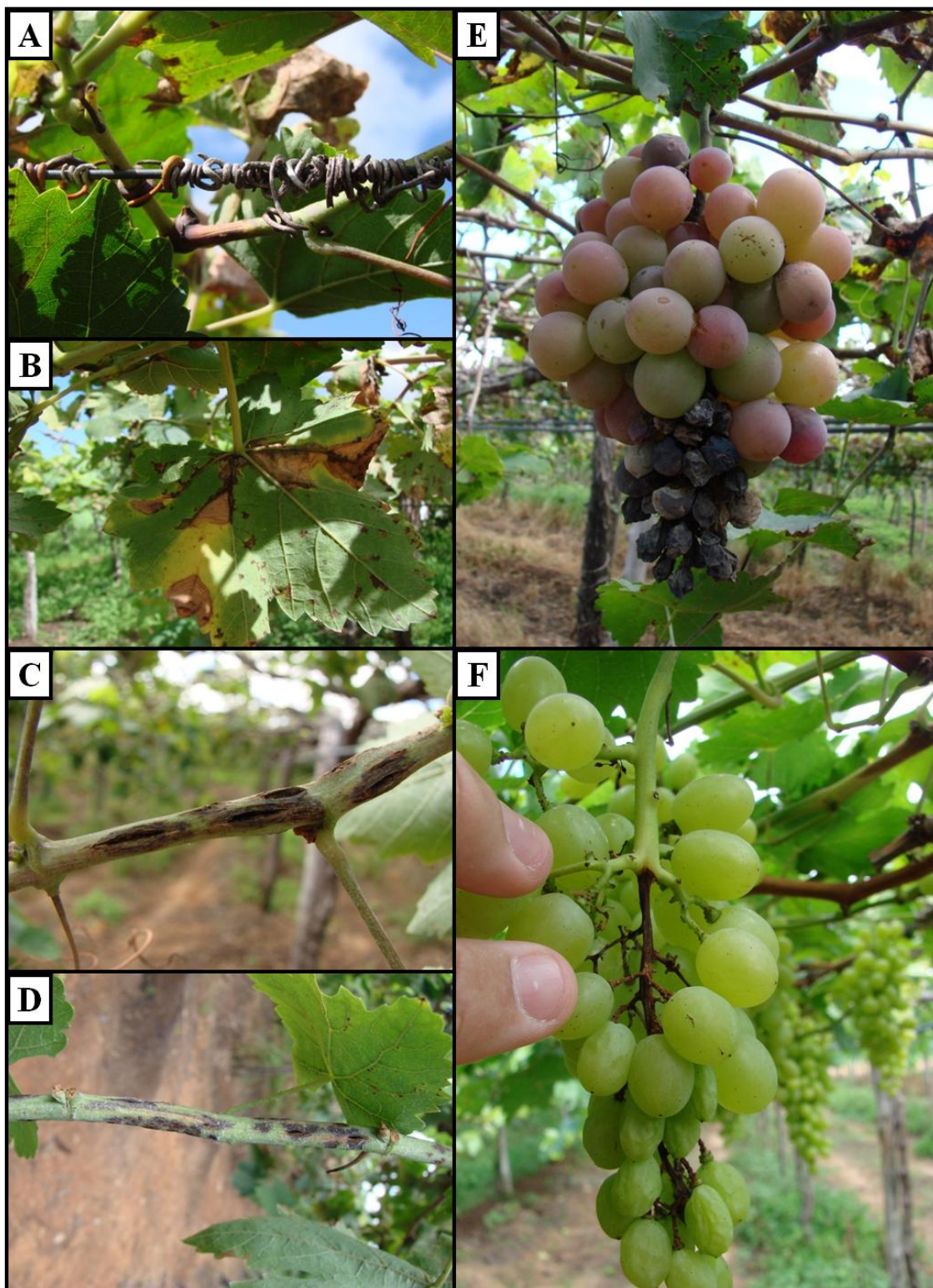


Figura 2. A) Pontos necróticos na folhas; B) Bagas apodrecidas, da variedade Red Globe; C) Mancha foliar necrótica; D) Formação de cancrios no caule; E) Cancro em ramos novos; F) Murcha de bagas e necrose do engaço da variedade Thompson seedles.

1.7 Cancro Bacteriano da Videira: origem, disseminação e panorama atual

O primeiro relato de cancro bacteriano da videira no mundo ocorreu na Índia em 1969, na variedade Anab-e-Shahi, e a causa foi atribuída a uma bactéria inicialmente classificada como *Pseudomonas viticola* sp. por Nayudu (1972). Sendo posteriormente reclassificada por Dye, (1978), como *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Xcvi).

Em março de 1998 o cancro bacteriano da videira foi detectado pela primeira vez no Brasil (MALAVOLTA et al., 1998; LIMA et al., 1998), presente no polo Petrolina (PE) – Juazeiro (BA), na região do Submédio São Francisco (Figura 3), época em que já se destacava como a principal região produtora de uvas finas de mesa do País. A incidência da bacteriose ultrapassava 90% de plantas amostradas na estação chuvosa do ano corrente, sendo, as variedades Red Globe e Sagraone as mais afetadas (LOPES & NASCIMENTO, 2004).

Segundo Freire & Oliveira (2001), o patógeno foi introduzido inadvertidamente por produtores do Vale do São Francisco, através de estacas da variedade Red Globe trazidas da Índia.

Anos mais tarde, estudos de variabilidade genética realizados por Trindade et al. (2005), mostraram que os isolados brasileiros e o isolado tipo NCPPB 2475, proveniente da Índia, possuíam perfis genômicos muito próximos, o que suporta essa hipótese de introdução.

Uma vez no Brasil, o patógeno encontrou na região semiárida nordestina, condições favoráveis de temperatura para seu desenvolvimento e disseminação. Devido à localização geográfica de fronteira, rapidamente foi disseminada para estados próximos. Tanto que em maio de 1998 os sintomas característicos da doença foram observados em ramos e folhas das variedades Red Globe, Itália e Ribier em cultivos comerciais da região de Teresina – PI, o que indicava o segundo relato do patógeno no país (MALAVOLTA et al., 1999).

Entre os anos de 1998 e 1999 o cancro bacteriano já havia sido encontrado em parreirais de municípios vizinhos a Petrolina e Juazeiro, tais como Santa Maria da Boa Vista em Pernambuco e Curuçá na Bahia.

No ano de 2001 foram feitas inspeções fitopatológicas no Município de Jaguaruana – CE e comprovou-se a ocorrência do cancro bacteriano nas variedades Red Globe, Flame e Sagraone daquela região (FREIRE & OLIVEIRA, 2001) e comprovando que a doença disseminava-se pelo Nordeste.

Em julho de 2006, em plantações comerciais de uva de Boa Vista – RR foram observadas plantas com sintomas do cancro bacteriano da videira. A partir daí, testes foram realizados pelo laboratório de fitopatologia da Embrapa, que confirmaram a doença em Roraima, culminando no quinto relato da bacteriose no país. Os autores Halfed-Vieira & Nechet (2006) explicam que os parreirais de Boa Vista teriam sido iniciados com material propagativo oriundo de Petrolina – PE, foco inicial da bacteriose, sendo essa a causa mais provável da introdução da doença no estado.

Durante o mesmo ano, o cancro bacteriano atingiu Formosa-GO, presente em porta enxertos de videira IAC-572 procedentes de Pirapora- MG. Os mesmos foram eliminados após a confirmação da presença da bactéria, ficando assim o estado livre da enfermidade (JUNQUEIRA et al., 2006).

Após oito anos da introdução do cancro no país, a bacteriose já havia sido disseminada para seis estados da federação (Figura 4).

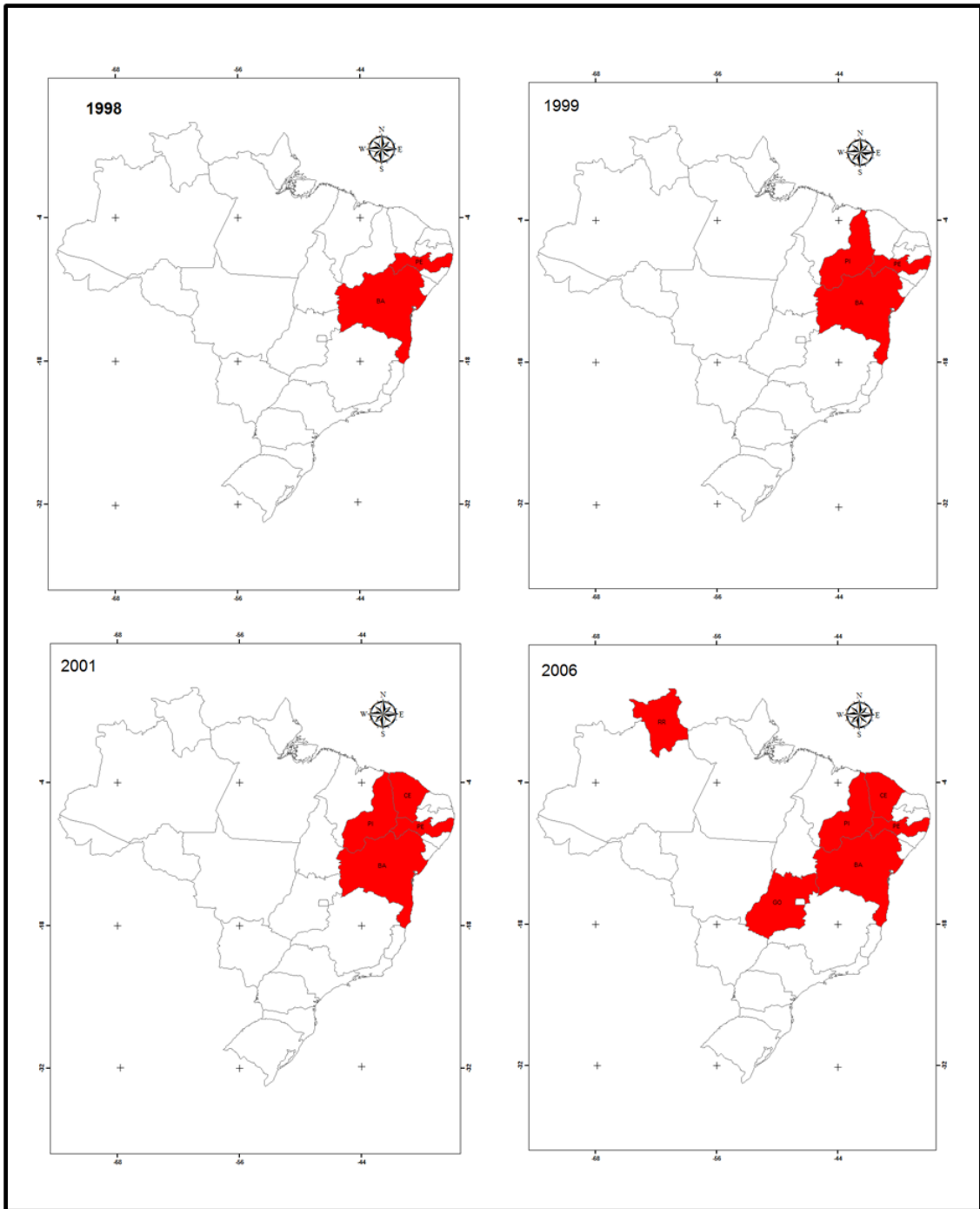


Figura 3. Disseminação do cancro bacteriano da videira, ordem cronológica de relatos em diferentes estados brasileiros.

No final de 2009, mais sintomas do cancro bacteriano da videira na variedade Red Globe foram observados, e desta vez, em pomares de Tupi Paulista, Estado de São Paulo. Por meio de testes patológicos e moleculares foi confirmada a presença *Xcvi*. O procedimento de erradicação das plantas infectadas foi adotado, e aproximadamente 4.700 plantas foram destruídas. Segundo levantamento realizado nas regiões produtoras do Estado de São Paulo, não foi encontrado nenhum outro pomar contaminado (RODRIGUES et al., 2011).

Ainda em 2009, segundo Tomaz et al. (2011) medidas de erradicação de parreirais novamente tiveram que ser tomadas, pois videiras da variedade Red Globe estavam manifestando sintomas de cancro, só que dessa vez no estado do Paraná, mais precisamente no município de Cianorte-PR, fato que comprova relatos da doença nas cinco regiões brasileiras (Figura 4).

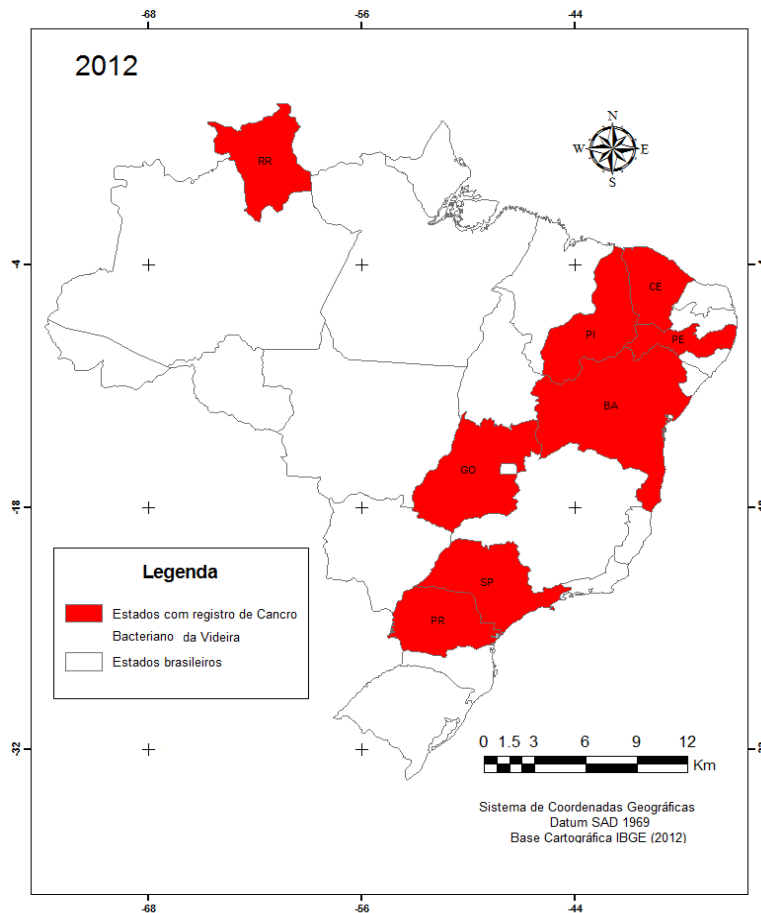


Figura 4. Panorama atual, dos estados brasileiros onde já ocorreram relatos do cancro bacteriano da videira.

Apesar de recentes e crescentes relatos espalhados pelo território nacional, o agente causal do cancro bacteriano da videira é ainda considerado uma Praga Quarentenária presente, que de acordo com a Instrução Normativa DAS nº 38 de 14 de outubro de 1999, é uma praga de importância econômica, mas que não está amplamente distribuída no país, mas que estaria restrita aos Estados de Pernambuco, Bahia, e Ceará (MAPA, 2012).

CAPÍTULO I

TÉCNICAS CLÁSSICAS E MODERNAS NA IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA DE *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*

RESUMO

TOSTES, Guilherme de Oliveira. **Técnicas clássicas e modernas na identificação polifásica de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola***. 2012. 94 páginas. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia com ênfase Fitossanidade). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Nos últimos anos, estudos de identificação do grupo de bactérias *Xanthomonas* vêm se intensificando com emprego da caracterização polifásica. Por outro lado, até o presente momento a taxonomia de *Xcvi* é indefinida. Sendo assim, a presente pesquisa propôs contribuir ao avanço dos estudos de identificação de estirpes desta bactéria, de modo a projetar futura discussão sobre reavaliação taxonômica deste importante patógeno. Para a realização dos trabalhos incursões foram realizadas em propriedades comerciais, produtoras de uvas na Região do Médio Vale do São Francisco, onde foram realizadas coletas de partes vegetativas e reprodutivas, com e/ou sem sintomas do cancro bacteriano da videira, as quais foram levadas ao Laboratório de Fitossanidade do Instituto de Agronomia da UFRRJ (Fitolab). Após detecção e isolamento da bactéria *in vitro* realizou-se ensaios para caracterização morfológica, bioquímica, fisiológica e molecular dos isolados. As colônias, em diferentes meio de cultura, desenvolveram massas bacterianas brilhantes, evidenciando certa transparência e cor branca característica que permitiu diferenciá-la de espécies de *Xanthomonas* pigmentadas. Além disso, observou-se a produção de muco, elasticidade, tamanho entre 0,4 a 0,8 cm, formas arredondadas, homogêneas, com bordas lisas e elevação. As estirpes de *Xcvi* não apresentaram respostas bioquímicas e fisiológicas diferentes de outras espécies de *Xanthomonas campestris* com os testes empregados. Com relação ao estudo molecular, alcançou-se a amplificação das regiões 16S rDNA de *Xcvi* e o sequenciamento dos mesmos. Fato que resultou no depósito, de maneira pioneira, das sequências no Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI), recebendo do NCBI os seguintes códigos de acesso: ENA4560 JQ513811, XCV50 JQ513812, ENA4598 JQ513813, ENA4604 JQ513814, XCV049 JQ513815, XCV074 JQ513816, ENA4597 JQ513817, ENA4605 JQ513818. Dessa forma, além das características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas, a comunidade científica mundial passa a dispor também de acesso a oito sequências da região 16S rDNA *Xcvi*, possibilitando comparações com sequências de estirpes investigadas como pertencentes a *Xcvi*.

Palavras-chave: caracterização; morfológica; bioquímica; molecular; *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*.

ABSTRACT

TOSTES, Guilherme de Oliveira. **Classic and modern techniques in polyphasic identification of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola***. 2012. 94 pages. Dissertation (Master of Science in Crop Science/Plant Pathology). Agronomy Institute, Crop Science Department, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

In recent years, studies on identification of the *Xanthomonas* group have become more intense with use of strain polyphasic characterization. However, the taxonomy of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (*Xcvi*) is still unclear. This study was designed to advance the identification of strains of this bacterium. On doing so, further discussion on taxonomic review of this important pathogen can be enhanced. The research was based on surveys of grape grower areas located in the Middle São Francisco River Valley, where samples of canker symptomatic and asymptomatic grapevine vegetative and reproductive parts were obtained. After bacterial detection, *in vitro* isolation of the bacterium assays were performed to characterize the isolates morphologically, biochemically, physiologically and molecularly. The colonies grown in various culture media, developed bright bacterial mass, some transparency, and white color which allowed differentiation from pigmented *Xanthomonas* species. Besides, mucus production with elasticity, and round, homogeneous colonies with smooth edges and elevation, sized from 0.4 to 0.8 cm were also found. The *Xcvi* strains tested did not show differential physiological or biochemical responses as compared to other species of *Xanthomonas campestris*. The molecular study performed, resulted on the amplification and sequencing of 16S rDNA regions of *Xcvi* which allowed the storage of the sequences in the National Center for Biotechnology Information (NCBI), receiving the following access codes: ENA4560 JQ513811, XCV50 JQ513812, ENA4598 JQ513813, ENA4604 JQ513814, JQ513815 XCV049, XCV074 JQ513816, ENA4597 JQ513817, ENA4605 JQ513818. Hence, in addition to morphological, biochemical and physiological descriptions, the scientific community may also have access to eight sequences of 16S rDNA *Xcvi*, enabling comparisons with sequences of strains supposedly belonging to *Xcvi*.

Key words: morphological; biochemical; molecular biological; characterization; *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*.

1 INTRODUÇÃO

Tida, por fitobacteriologistas, como sendo a primeira bactéria relatada como ocasionadora de doença em plantas, pelo estudioso alemão Friedrich M. Dranert no ano de 1869 (ROBBS & RODRIGUES NETO, 1993), o gênero *Xanthomonas*, desde então, vem sendo alvo de inúmeros estudos.

Oficialmente a denominação de gênero *Xanthomonas* foi feita por Dowson em 1939, que a classificou assim provavelmente baseado na cor amarela, que as colônias expressavam quando isoladas *in vitro*. Desde então, as discussões taxonômicas a respeito desse grupo de fitobactérias ocorrem e inúmeras espécies foram descritas pertencendo a esse gênero, dentre as quais a *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson (ROBBS & RODRIGUES NETO, 1993), ocorrendo em diferentes culturas de importância agrícola e ocasionando desde machas foliares até cancos.

No ano de 1969 na Índia, foi observado em videiras da variedade Anab-e-Shah, sintomas de cancro e manchas foliares que refletiam em perdas de produção. Diante disso estudos foram realizados e Nayudu (1972) baseado em características morfológicas das colônias isoladas, bem como na cor apresentada por elas, identificou o agente causal desta doença como sendo *Pseudomonas viticola* sp. Posteriormente, Dye em 1978, baseado em testes bioquímicos, entre outros, denominou a mesma, como sendo *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye.

Todavia, Vauterin et al. (1995) ao estudar 183 cepas de *Xanthomonas*, usando ferramentas de biologia molecular, sugerem que *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (*Xcvi*) seja tratada como *Xanthomonas* sp. até que estudos mais esclarecedores venha ser realizados a respeito da taxonomia dessa espécie.

Passados 29 anos do primeiro relato no mundo, o cancro bacteriano da videira foi relatado no Brasil por Malvolta et al. (1998) e Lima et al. (1998), que descrevem o agente causal da doença como pertencente ao Domínio *Bacteria*, Filo *Proteobacteria*, Classe *Gamaproteobacteria*, Ordem *Xanthomonadales* e Família *Xanthomonadaceae*, da mesma forma que Nayudu (1972).

Diante da agressividade com que vem afetando os parreirais nordestinos, bem como considerando-se o potencial de disseminação, considera-se primordial novos estudos sobre este patógeno, sobretudo que investiguem métodos de detecção, identificação e manejo de *Xcvi*.

Nessa direção, Takita et al. (2004), ao realizarem pesquisas nas quais analisaram a região *rpf* (Regulação de Fatores de Patogenicidade) na diferenciação de espécies de *Xanthomonas*, observaram que *Xcvi* não apresentou tal região, mostrando maior similaridade com *X. axonopodis* pv. *citri*, sendo então agrupada com outras espécies de *Xanthomonas*. No estudo, concluiu-se que *Xcvi* não pertenceria ao grupo de patovares de *X. campestris*. Isso porque, apesar de pertencer ao gênero *Xanthomonas*, *Xcvi* não produz o pigmento xanthomonadina característico deste grupo.

Araújo et al. (2005), empregando anticorpos policlonais desenvolvidos especificamente para esse patógeno, observaram que os mesmos foram altamente reativos para *Xcvi*, mas também apresentaram reatividade a *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*, os autores argumentaram alegando proximidade taxonômica das duas espécies.

Por outro lado, Nascimento et al. (2005), conduziram estudos *in vitro* visando conhecer melhor esse patógeno e observaram que era capaz de crescer em meio de cultura líquido em temperaturas variando de 5 a 35°C, sendo que o crescimento ótimo para as colônias é entre 27 a 29 °C. Adicionalmente, também observaram que o pH ótimo para esta bactéria é de 7,5 e que o seu crescimento decresce a partir de 3% de

NaCl, chegando à zero na concentração de 6%. Mais uma vez, tais características comportamentais são semelhantes a outros representantes do gênero *Xanthomonas*.

Quando avaliada sob aspecto de tolerância ao cobre, algumas estirpes desenvolveram colônias até 350 µg. ml⁻¹. Casos em que foram observados a presença do gene *copA* (MARQUES, 2007), provavelmente o responsável por tal característica.

Em estudos moleculares, Trindade et al. (2005) caracterizaram 41 isolados de *Xcvi* e demonstraram através da análise conjunta dos resultados REP, ERIC e BOX-PCR, a formação de cinco subgrupos com 56% similaridade. O marcador REP-PCR mostrou reprodutibilidade e eficiência em caracterizar a variabilidade de *Xcvi* podendo também ser útil como uma técnica adicional para identificação da bactéria.

Nos últimos anos, estudos de identificação referentes a esse grupo de bactérias vêm se intensificando com emprego de diferentes ferramentas, denominada de caracterização polifásica, proposta por Vandamme et al. (1996). Essa associação de diferentes métodos na identificação permitiu reclassificação de diferentes espécies, entre as quais *Xanthomonas citri* pv. *citri* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. No entanto, *Xcvi* ainda é considerada com taxonomia indefinida (PARKINSON et al., 2009). Diante disso, a presente pesquisa teve como objetivo realizar a identificação polifásica de estirpes de *Xcvi*, fazendo uso de métodos morfológicos, bioquímicos, fisiológicos e moleculares, de modo a projetar futura discussão sobre reavaliação taxonômica deste importante patógeno.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta de material e obtenção de isolados

Foram realizadas visitas em propriedades comerciais, produtoras de uvas no Perímetro Irrigado Senador Nilo Coelho, região de Bebedouro no município de Petrolina-PE, onde se procederam coletas *in situ* (Figura 5) de partes vegetativas (folhas e ramos) e reprodutivas (inflorescências e cachos já formados) de videiras das variedades Red Globe, Benitaka Brasil, Sugaone, Thompsom Seedless e Itália que apresentavam ou não sintomas característicos do cancro bacteriano da videira. As amostras foram acondicionadas no campo e depois levadas ao Laboratório de Fitossanidade do Instituto de Agronomia da UFRRJ (Fitolab).

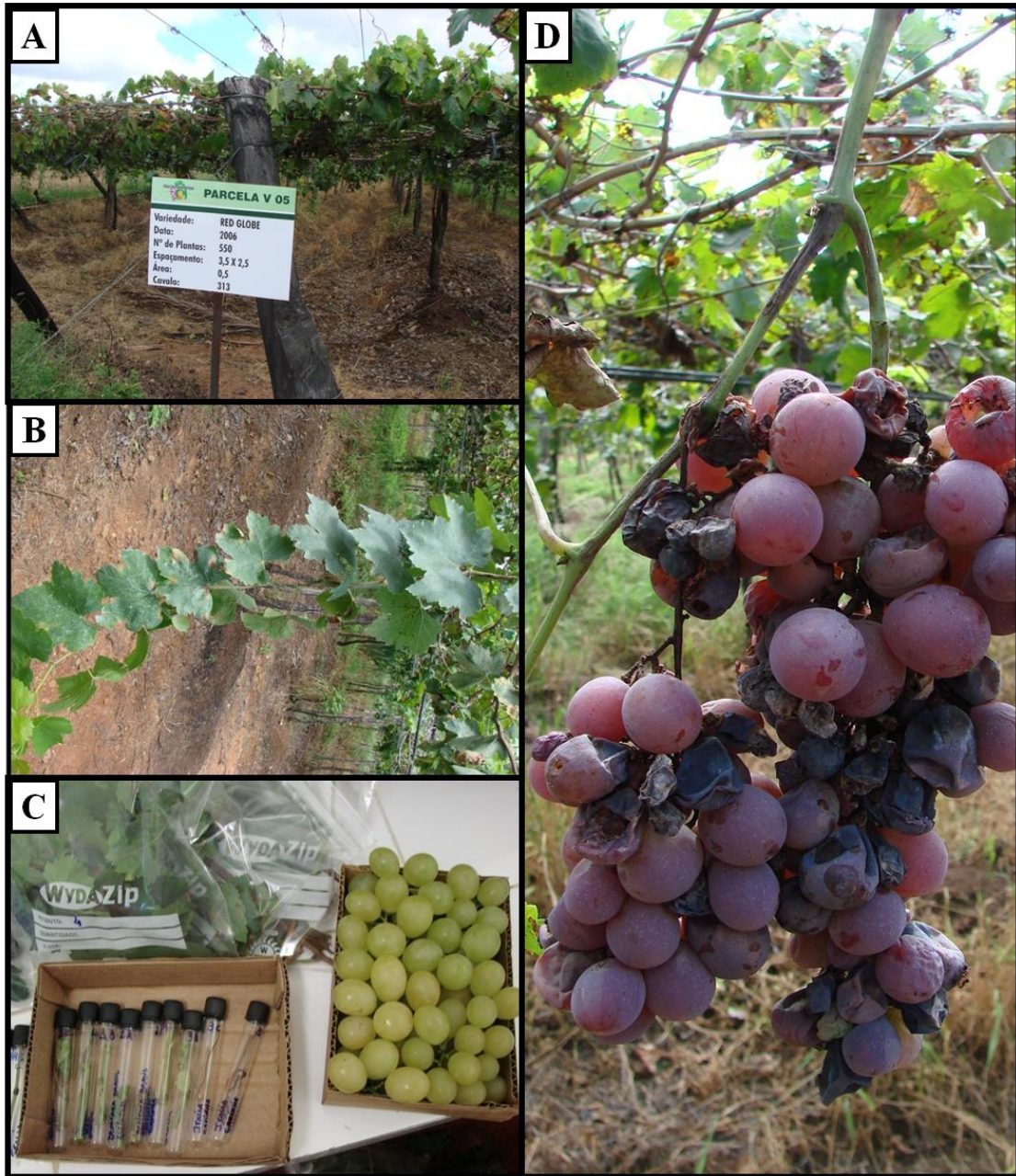


Figura 5. Área produtora comercial de uva finas para mesa *Vitis vinifera*, onde se procederam coletas *in situ* A) Parreiral plantado com a variedade Red Globe; B) Detalhe de folhas manifestando bordas com manchas necróticas; C) Acondicionamento de amostras coletadas: folhas em embalagem plástica hermética, tubos rosqueados contendo gavinhas e caixa de papelão para transporte de bagas da variedade Itália; D) Sintomas da expressão do cancro em cacho de uva da variedade Red Globe, evidenciando prejuízo a produtividade da videira.

Testes de detecção de exsudação foram realizados de modo a caracterizar a presença de células bacterianas nos materiais analisados. O procedimento consistiu na retirada de cortes histológicos finos das amostras, obtidos da interface do material infectado com parte do tecido ainda sadio, os quais foram depositados sobre uma lâmina de vidro, adicionando-se na sua superfície duas gotas de água destilada

estéril (ADE). Em seguida, recobriu-se com uma lâmina de vidro, de modo a possibilitar observação ao microscópio ótico, e assim detectar o fenômeno da exsudação de bactérias para o meio líquido (ROMEIRO, 2001).

As amostras nas quais foram constatadas exsudação, foram lavadas e enxugadas cuidadosamente e com o auxílio de uma lâmina de aço flambada sob chama oxidante, cortou-se fragmentos dos tecidos infectados não maiores que 0,5cm X 0,5cm. Com emprego de pinça também flambada, os fragmentos foram transferidos para a solução de 2% de NaClO, por um minuto. Após, efetuou-se a lavagem do material com ADE, por três vezes, para retirar o excesso do desinfetante. Com auxílio de uma pipeta automática depositou-se no fundo de uma placa de Petri estéril, uma gota de ADE juntamente com os cortes vegetais e procedeu a maceração dos tecidos. Após, à difusão das células bacterianas do interior do tecido para ADE, formou-se a suspensão bacteriana (inóculo) e através da alça de Drigalsky flambadas, alíquotas do inóculo foram semeadas sobre a superfície do meio de cultura Nutriente Ágar (NA) (LEVINE, 1954) em placas de Petri. Por fim, incubou-se as placas inoculadas em estufa de crescimento bacteriano, regulada à 28 °C, onde permaneceram por cerca de 72 horas, possibilitando o desenvolvimento das colônias bacterianas.

2.2 Teste de Patogenicidade

Para averiguar a patogenicidade dos isolados obtidos, realizou-se os postulados propostos por Koch (1884). Para tal, células bacterianas foram crescidas em meio de cultura NA, por cerca de 24h a 48h (ROMEIRO, 1973). Em seguida, adicionou-se a tubos com a cultura em meio inclinado, solução salina (NaCl a 0,85% em ADE) até aproximadamente 1/3 da altura dos tubos. As concentrações dos inóculos foram previamente ajustadas para aproximadamente 10^8 ufc/ml, em espectrofotômetro digital, regulado a 560nm e 85% de transmitância. As suspensões dos isolados foram então infiltradas com auxílio de seringa hipodérmica com agulha no mesófilo foliar de mudas Red Globe, mantidas em BOD. Após a expressão dos sintomas procedeu-se o novo isolamento e restos vegetais das plantas utilizadas foram destruídas mediante autoclavagem.

2.3 Caracterização morfológica das colônias

Características morfológicas das colônias isoladas foram avaliadas conforme os seguintes aspectos: cor, transparência, tamanho, forma, borda, homogeneidade, elevação, muco e elasticidade.

O tamanho, forma, borda, homogeneidade, transparência e elevação foram observadas em colônias isoladas. De outra forma, características de cor, muco e elasticidade foram consideradas avaliando-se massa celular surgida da riscagem em placa de Petri (FONSECA et al., 2000) e comparadas com colônias de *Bacillus* sp., *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* (Xcm), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), *Xanthomonas axonopodis* (Xa).

Adicionalmente, tais características foram avaliadas quanto ao desenvolvimento das colônias após 48 horas a 29°C, em quatro diferentes meios de cultura: Nutriente Ágar (NA), Dygs, Batata Dextrose Ágar (BDA), NYDA.

2.4 Caracterização Bioquímica

Os isolados obtidos conforme descrito acima, foram submetidos a testes bioquímicos e fisiológicos, seguindo protocolo para identificação de bactérias fitopatogênicas (SCHAAD, 1988). Nesse sentido, foi realizado: reação de Gram, utilização de asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio, relação com o oxigênio livre, oxidase, hidrólise de amido, hidrólise de gelatina, hidrólise de esculina, crescimento em tetrazólio, temperatura de crescimento, proteólise de leite, catalase, crescimento em diferentes fontes de carbono e compostos correlatos (carboidratos, álcoois e glicosídeos), produção de uréase, tolerância a NaCl, produção de H₂S e ação sobre nitratos. Paralelamente aos testes tradicionais foi utilizado o Kit API 20E, indicado para identificação de bactérias gram negativas não fastidiosas.

2.6 Caracterização molecular

2.6.1 Extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) total

Oito estirpes de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* foram cultivadas por 48 horas sob agitação de 200 rpm a 30°C em tubos de ensaio de 15 ml contendo 5 ml meio de cultura DYGS com pH 7,0 (RODRIGUES NETO et al., 1986). Alíquotas de 2 ml das culturas foram transferidas para microtubos, que foram então submetidos à centrifugação a 4.000 x g por 10 min. a 4 °C. Ao final, o meio de cultura foi descartado e o sedimento bacteriano recuperado foi ressuscitado em 567 µl de solução contendo 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0 e 1 mM de EDTA pH 8,0 (Solução T₁₀E₁). Após completa ressuspensão, 30 µl de SDS a 10% (m/v) e 3 µl de solução de proteinase K a 20 mg.ml⁻¹ (m/v) foram adicionados e, após homogeneização, as amostras foram incubadas a 37 °C por 1 h. Após incubação, 100 µl de solução de NaCl a 5 M e 80 µl de solução de CTAB a 10% (m/v) em NaCl 0,7 M foram adicionados, sendo então homogeneizadas e, incubadas por 10 min. a 65 °C, seguido por 1 h sob agitação leve, a temperatura ambiente. A primeira etapa de extração foi realizada pela adição de 1 volume de uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v/v) e homogeneização durante 2 min por inversão. As amostras foram, em seguida, centrifugadas a 18.514 x g por 10 min e o sobrenadante obtido foi transferido para um novo microtubo. Em seguida, adicionou-se 2,5 µl de RNase A (10 mg.ml⁻¹) e, após homogeneização, as amostras foram incubadas a 37 °C por 1 h. Decorrido este tempo, foram realizadas duas etapas consecutivas de extração: uma com 1 volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v/v) e outra com 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v). Após a extração, o DNA foi precipitado pela adição de 0,6 volumes de Isopropanol 100%, seguido pela etapa de lavagem com 300 µl de etanol 70%, centrifugação a 12.000 x g por 5 min., a 4°C. Esse procedimento foi repetido duas vezes, sendo que a cada etapa o precipitado foi ressuscitado com movimentos suaves, de modo a garantir a completa remoção de sais, que por ventura estivessem impregnados no DNA. Terminada essa etapa, o precipitado foi incubado em estufa a 37 °C para volatilização de traços de etanol advindos do processo de lavagem. Uma vez seco, o precipitado foi ressuscitado em 100 µl de água ultrapura livre de DNases.

Uma vez finalizada a purificação do DNA total das estirpes, foi feita a avaliação da qualidade, bem como, a estimativa da quantidade do material obtido ao final do processo de purificação. Para isso, uma alíquota de 2 µl de DNA total obtido foram adicionados 2 µl de tampão de carregamento (*loading buffer*) e, então submetido à eletroforese em gel de agarose 0,7% (m/v) em tampão TAE 1X (40 mM de Tris-acetato,

pH 8,0 e 1 mM de EDTA pH 8,0), sendo utilizado o marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen, Cat. No. 10787-018) como referência a uma voltagem de 90 V por 45 min. Em seguida, procedeu-se a coloração do gel em solução de brometo de etídeo ($5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) e visualização sob luz ultravioleta (UV) na faixa de 253 nm empregando trans-iluminador acoplado ao sistema de fotodocumentação KODAK[®] Gel Logic 100 (KODAK Scientific Imaging Systems, Cat. No. 172.8468) e um computador. A análise dos géis foi realizada com o programa de aquisição e análise de imagens da KODAK[®] 1D Image Analysis (KODAK Molecular Imaging Systems, Cat. No. 811.2344).

A concentração e a pureza do DNA também foram determinadas por espectrofotometria empregando-se o equipamento N-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc., EUA). O grau de pureza foi avaliado pela relação 260 e 280 nm, sendo que valores entre 1,8 e 2,0 indicam amostras com alto grau de pureza e, sua concentração determinada através da leitura da absorbância a 260 nm, seguindo a seguinte relação: absorbância 1 corresponde a $50 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ de DNA fita dupla.

2.6.2 Amplificação do 16S DNAr

A sequência correspondendo a um fragmento de cerca de 1500 pb do 16S DNAr foi amplificada a partir do DNA total extraído em termociclador Mastercycler[®] gradient (Eppendorf Scientific, Inc., EUA). O sistema da reação continha: 50 ng de DNA total; 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP); 10 pmol dos oligonucleotídeos 27F (5'- GAGTTTGATCCTGGCTCAG -3') e Amp-2 (5' - AAGGAGGTGATCCARCCGCA - 3') ; 10 mM de Tris-HCl pH 9,0; 50 mM de KCl; 1,5 mM de MgCl_2 ; 5% de DMSO e 5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Cat. No. 11615-010) em um volume final de 50 μl . As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C durante 3 min seguido de 35 ciclos consecutivos que consistiam de: desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento durante 1 min a 58°C e alongamento a 72°C durante 2 min e, por fim, um ciclo final de alongamento a 72°C durante 5 min e estoque a 4°C. O produto das reações de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) em tampão TAE 1X, visualizados sob iluminação UV após coloração com brometo de etídeo e comparação com o padrão 1 kb Plus DNA ladder, empregado como referência.

2.6.3 Sequenciamento do produto de amplificação do 16S DNAr

Para o sequenciamento do produto amplificado do 16S DNAr foram utilizados 200 ng dos produtos de PCR purificados, 1 μl de iniciador a 5,0 μM , 4,0 μl do kit "TE Dynamics Kit"(GE Healthcare) e água ultrapura para o volume final de 10 μl . As condições para a reação de sequenciamento foram: 25 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão de 95°C por 25 segundos, 58°C por 15 segundos; 60°C por 1 minuto, respectivamente. Após a reação de marcação, as amostras foram precipitadas por meio da adição de 1,0 μl de solução de acetado de amônio a 7,5 M e 27,5 μl de etanol e incubadas a 4°C por uma noite. Em seguida, foram submetidas à centrifugação de 3.220 x g por 45 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com 100 μl de etanol a 70% e novamente centrifugado 3220 x g por 10 minutos a 4°C. As amostras foram secas ao ar e ressuspensas em 7,5 μl de tampão de carregamento para Mega BACE (loading buffer) e analisadas em sequenciador automático MegaBACE1000 (GE Healthcare).

As sequências obtidas das estirpes de *Xcvi* (Tabela 2), foram comparadas com outras oriundas do banco de dados Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI) pelo programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL, et al., 1997) para nucleotídeos. As sequências em estudo foram alinhadas com as de *Xanthomonas codiae* (NR026391), *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* (EF989733), *Xanthomonas axonopodis* (DQ991194), *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* (EF989732), *Xanthomonas melonis* (AB558558), *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (AB558555), *Xanthomonas campestris* pv. *zantedeschiae* (AY605124), *Xanthomonas bromi* (NR026390), *Xanthomonas axonopodis* pv. *syngonii* (AY576650), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (NC003902), *Xanthomonas axonopodis* (AE008923), *Xanthomonas campestris* (gi78033986) e como controle externo fora do gênero *Xanthomonas* foi usado uma sequência de *Ralstonia detusculanense* (AF280433).

Tabela 2. Código, ano, local e variedades de origem das estirpes de *Xcvi* que tiveram o DNA extraído.

Estirpe	Ano	Local	Variedade
XCV074	2009	Petrolina/PE	Itália
XCV049	2009	Petrolina/PE	Sugraone
XCV050	2009	Petrolina/PE	Sugraone
ENA 4560	1999	Petrolina/PE	Red Globe
ENA 4597	2010	Petrolina/PE	Itália
ENA 4598	2010	Petrolina/PE	Sugraone
ENA 4604	2010	Petrolina/PE	Thompson Sendless
ENA 4605	2011	Lagoa Grande / PE	Thompson Sendless

Por fim as sequências foram alinhadas com auxílio do programa do CLUSTALW (THOMPSON et al., 1994) e árvore filogenética construída pelo método de agrupamento de Neighbour-joining (SAITOU e NEI, 1987), através do programa MEGA (www.megasoftware.net) (KUMAR et al., 2004) e analisada pelo método de diferenças Bootstrap, com 1000 réplicas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível isolar das diferentes variedades coletadas, colônias bacterianas com características de *Xcvi*, porém tiveram patogenicidade comprovada as estirpes apresentadas na tabela 3.

Tabela 3. Isolados de *Xcvi* obtidos das coletas *in situ* com respectivas variedades e codificação.

Estirpe	Ano	Local	Variedade
ENA 4596	2010	Petrolina/PE	Red Globe
ENA 4597	2010	Petrolina/PE	Itália
ENA 4598	2010	Petrolina/PE	Sugraone
ENA 4599	2010	Petrolina/PE	Sugraone
ENA 4600	2010	Petrolina/PE	Red Globe
ENA 4601	2010	Petrolina/PE	Red Globe
ENA 4602	2010	Petrolina/PE	Red Globe
ENA 4603	2010	Petrolina/PE	Thompsom Sendless
ENA 4604	2010	Petrolina/PE	Thompsom Sendless

As colônias de *Xcvi* desenvolveram padrão de cor branca, sempre contrapondo-se as demais espécies do gênero avaliadas: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas axonopodis*, as quais resultaram em colônias de cor amarela típicas. Segundo Robbs et al.(1974), padrão semelhante de cor das colônias de *Xcvi* estudadas, foi observado em colônias de *Xcm*, o que mais uma vez reitera hipótese de proximidade taxonômica dessas duas espécies.

Além disso, colônias de *Xcvi* nos diferentes meio de cultura, desenvolveram massas bacterianas consistentemente brilhantes, de tamanhos variando de 0,4 a 0,8 cm, evidenciando certa transparência, formas arredondadas, bordos liso, homogênea, elevadas, com muito muco e elasticidade (Figura 6).

Tais características morfológicas de *Xcvi* colididas com aquelas desenvolvidas por *Xcm* nos permitiu sugerir diferenças sutis, tais como menor produção de muco por *Xcvi* (Figura 7 A e B), bem como formação de menor halo em teste de hidrólise do meio BDA em placas de Petri (Figura 7 C e D).

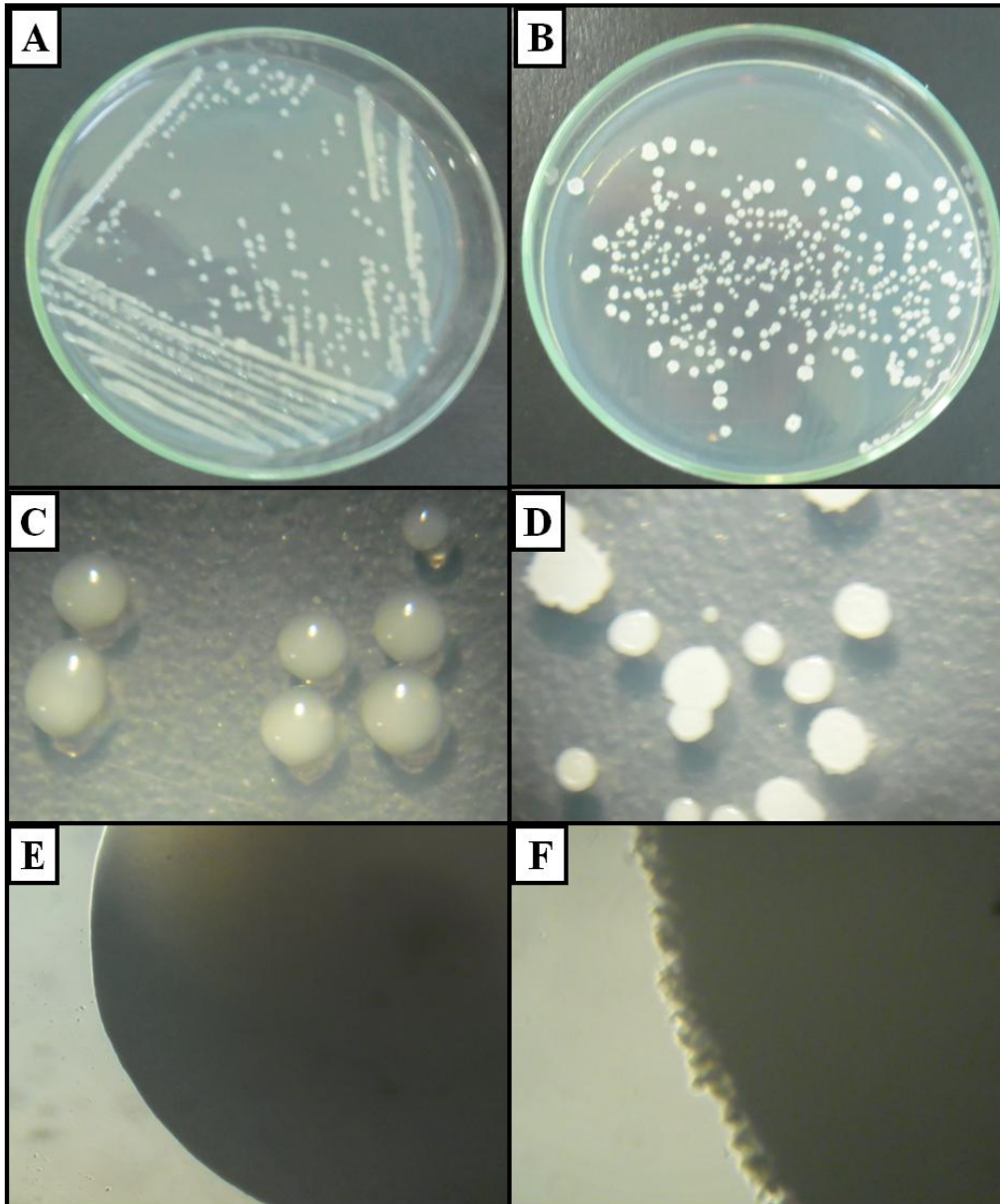


Figura 6. Características morfológicas desenvolvidas por estirpes de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (*Xcvi*) comparadas com *Bacillus* sp. A) Desenvolvimento de *Xcvi* em meio NA após 48h/28°C. B) Desenvolvimento de colônias de *Bacillus* sp., oportunista frequente em tentativas de isolamento *in vitro* de *Xcvi*, C) Detalhe de colônias evidenciando padrão de brilho, transparência e elevação típicas de colônias de *Xcvi*. D) Contraste das mesmas características descritas em C, desenvolvidas por colônias de *Bacillus* sp., E) Imagem ao microscópico ótico da borda lisa típica de colônias de *Xcvi* quando comparada com borda irregular de colônia de *Bacillus* sp (F).

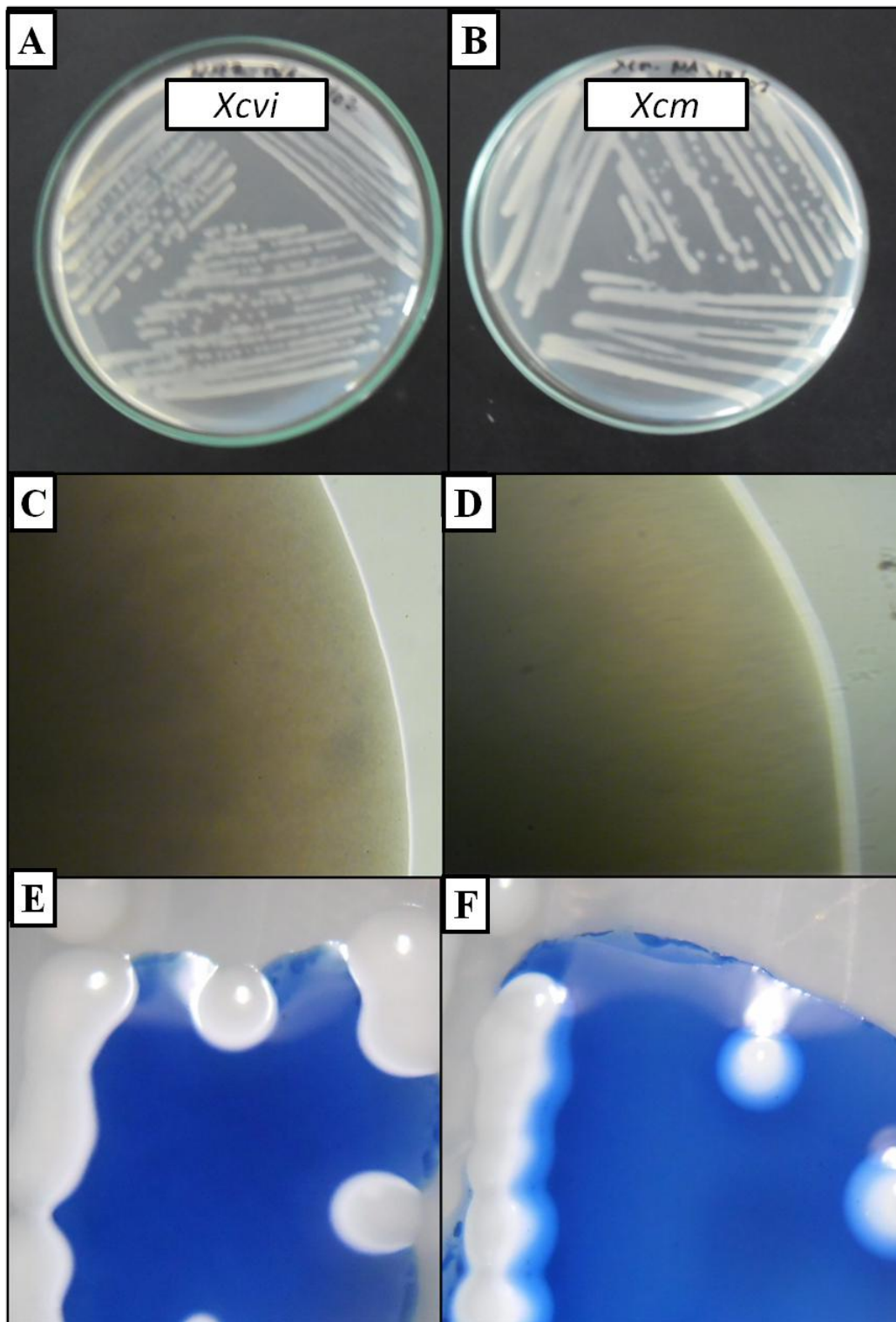


Figura 7. Comparação de algumas características morfológicas de contrastadas *Xcvi* com aquelas desenvolvidas por *Xcm*, quando crescidas em BDA, após 72 horas de incubação. A) Notar menor produção de muco (seta) por *Xcvi* que por *Xcm* (B); C) Halo resultante da hidrólise de amido produzido por colônias de *Xcvi* em placa de Petri, comparativamente menor frente ao halo mostrado em (D), produzido por *Xcm*; E) Detalhe de contraste obtido com adição do corante azul de algodão sobre meio de cultivo das duas espécies bacterianas. Observar (seta) menor formação de halo em *Xcvi* do que em *Xcm* (F).

Características metabólicas e fisiológicas das diferentes estirpes de *Xcvi*, resultaram em padrões típicos de espécies do gênero *Xanthomonas* (Figuras 8).

As estirpes de *Xcvi* utilizadas neste trabalho apresentaram células Gram negativas e crescimento estritamente aeróbico. Quanto ao emprego do com o emprego do Kit API 20 NE (Figura 8) observou-se respostas negativas para, redução de nitrato em nitritos e de nitratos em azoto; formação de Indol; fermentação glucose; arginina dihidrolase; urease; assimilação manitol; assimilação ácido caprato; assimilação ácido adipato; assimilação ácido caprato; assimilação ácido adipato; Assimilação ácido fenilacetato. De outra forma, verificou-se respostas positivas para oxidase e oxidação, hidrólise de amido, hidrólise esculina; hidrólise gelatina; B-galactosidase; assimilação glucose; assimilação manose; assimilação N-acetilglucosamina; assimilação maltose; assimilação potássio gluconato; assimilação malato; assimilação citrato de trisódio.. Os resultados observados corroboram com os demonstrados por Araujo (2001) em ensaios realizados com *Xcvi*, bem como parte dos resultados apresentados por Gama et al. (2011), que realizaram caracterização polifásica de isolados de *Xanthomonas* apigmentados.

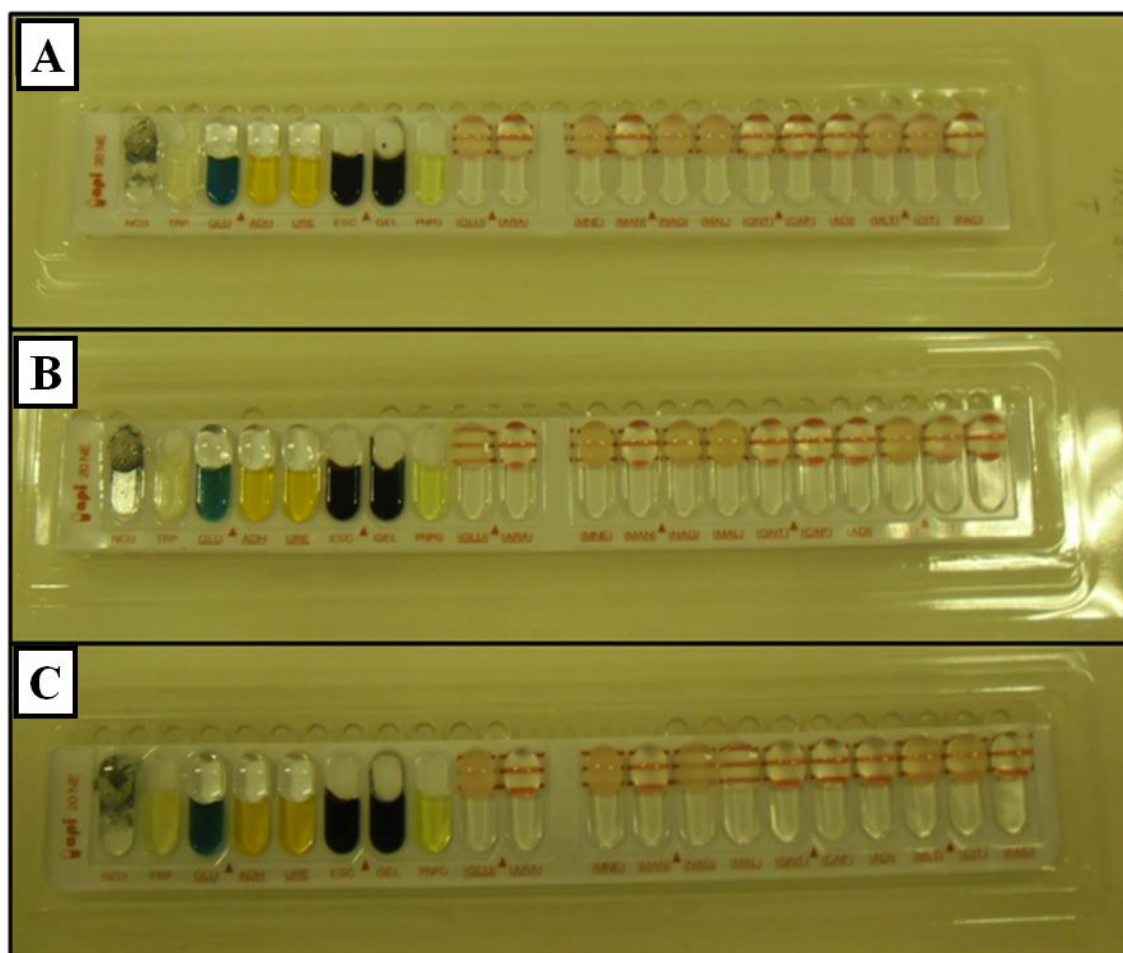


Figura 8. Avaliação do teste bioquímico API 20 NE, após 24 horas. Observar similaridade entre padrões de respostas desenvolvidos nos substratos do Kit, provocados por estirpes de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (A), *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* (B) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalyptos* (C).

Com relação ao estudo molecular, os primers 27F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG -3') e Amp-2 (5' - AAGGAGGTGATCCARCCGCA) amplificaram precisamente regiões 16S rDNA de *Xcvi* (Figura 9), o que permitiu o sequenciamento das mesmas. As sequências obtidas foram depositadas, de maneira pioneira no NCBI, recebendo os seguintes códigos de acesso: ENA4560 JQ513811, XCV50 JQ513812, ENA4598 JQ513813, ENA4604 JQ513814, XCV049 JQ513815, XCV074 JQ513816, ENA4597 JQ513817, ENA4605 JQ513818. Destaque-se a inexistência de depósito anterior de sequências de 16S rDNA *Xcvi* em bancos de diversidade genômica.

Técnicas moleculares vêm sendo empregadas em inúmeros estudos realizados com objetivo de contribuir na elucidação taxonômica do gênero *Xanthomonas*. Entre os trabalhos clássicos podemos citar o de Vauterin et al. (1995), que propuseram uma revisão completa desse gênero comentando que *Xcvi*, bem como outras espécies, estariam mal alocadas, propondo taxonomicamente que fossem denominadas de *Xanthomonas* sp. mais o patovar específico, até que estudos conclusivos fossem realizados quanto a taxonomia da espécie. Nesse contexto, é possível que o presente trabalho possa servir a um futuro estudo direcionado especificamente para a reclassificação taxonômica de *Xcvi*, haja vista que analisando o dendograma construído a partir das sequências de 16S rDNA de diferentes estirpes de *Xanthomonas* depositadas no NCBI (Figura 10), sete das oito sequências de *Xcvi* analisadas agruparam-se com outras sete sequências de espécies distintas com valores de *Bootstrap* 64%, indicando proximidade taxonômica, bem como a dificuldade de diferenciar tais espécies analisando o 16S rDNA. Por outro lado foi possível identificar com segurança a heterogeneidade entre as espécies *Xcvi* ao observar que a sequência (JQ513814) oriunda da estirpe ENA4604, que difere das demais *Xcvi* ao nível de 99% de *Bootstrap*, valor altamente significativo segundo Schneider (2007). Observação semelhante feita por Trindade et al. (2005) utilizando outra técnica, “primers” e empregando REP, ERIC e BOX, demonstraram que entre 40 isolados foi possível separação em cinco subgrupos, comprovando a heterogeneidade desse grupo de bactérias.

A diferenciação molecular de *Xcvi* frente a outras espécies de *Xanthomonas* ainda é difícil, conforme relatado por Parkinson et al. (2009), pois usando de sequências *gyrB* na avaliação de 203 isolados distintos, classificaram *Xcvi* como taxonomia indefinida da mesma forma que Vauterin et al. (1995).

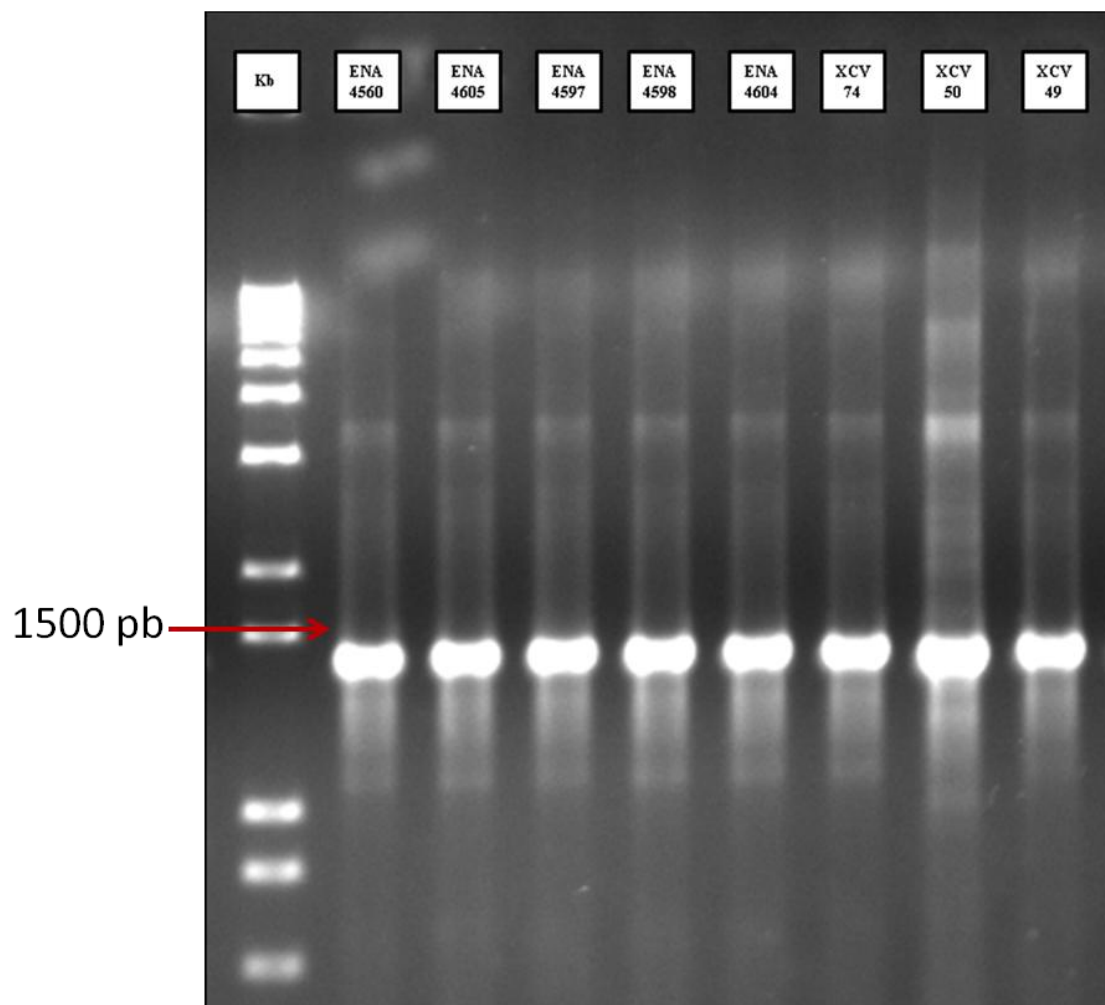


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de amplificação das regiões 16S de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. Notar na corrida do gel, similaridade de retenção e posicionamento das bandas de 16S rDNA.

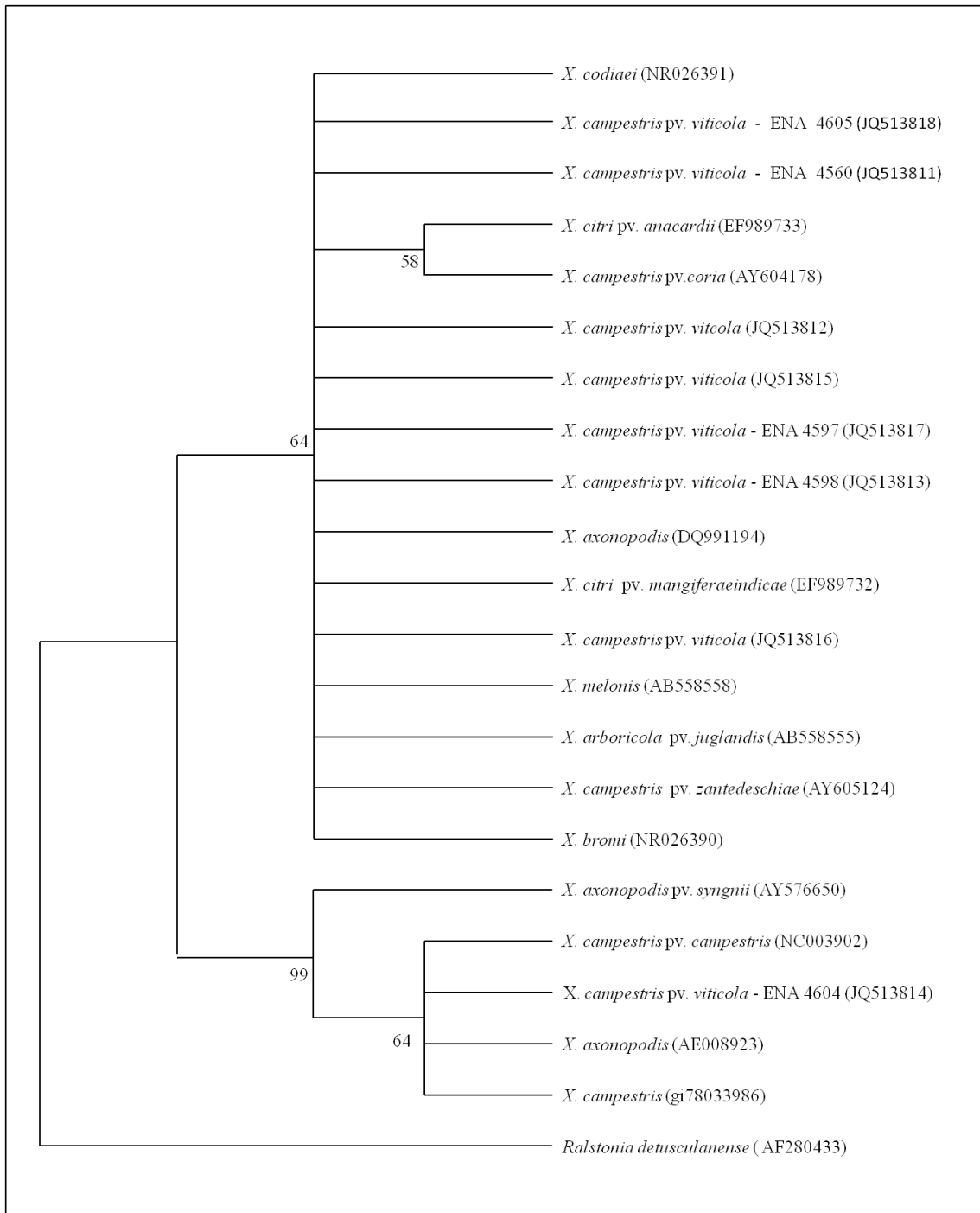


Figura 10. Árvore filogenética construída com sequências do gene DNAr 16S (1.420 pb) oriundas de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e de sequências obtidas no National Center For Biotechnology Information (NCBI) de outras espécies de *Xanthomonas*. O método utilizado foi *Neighbor-Joining* e modelo *Maximum Composite Likelihood* no programa Mega 4.1. Análise de *Bootstrap* com 1000 réplicas.

4 CONCLUSÕES

1. Foram identificadas as principais características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas de *Xcvi*, além de sequências da região 16S rDNA;
2. A pigmentação branca desenvolvida pelas colônias de *Xcvi* foi notoriamente a característica mais expressiva e prática quanto a morfologia.
3. A comunidade científica mundial passa a dispor de 8 (oito) sequências da região 16S rDNA *Xcvi*, depositadas no Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI), com os seguintes códigos de acesso: JQ513811, JQ513812, JQ513813, JQ513814, JQ513815, JQ513816, JQ513817, JQ513818. Avanço que possibilitará comparações de sequências de estirpes investigadas como pertencentes a *Xcvi*;
4. Árvore filogenética construída com sequências do gene DNAr 16S (1.420 pb) oriundas de *Xcvi*, confirma a proximidade taxonômica a outras espécies, bem como a diversidade genética dentro da própria espécie;
5. Estudos taxonômicos específicos de revalidação do pv. *viticola* deverão ser realizados em breve. Nessa direção, conjunto das informações disponibilizadas desses ensaios polifásicos de identificação poderão contribuir para alicerçar futura nomenclatura dessa espécie.

CAPÍTULO II

NICHOS DE SOBREVIVÊNCIA DE *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* EM TECIDOS DE BAGAS E SEMENTES DE VIDEIRA

RESUMO

TOSTES, Guilherme de Oliveira. **Nichos de sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em tecidos de bagas e sementes de videira.** 2012. 94 páginas. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia com ênfase Fitossanidade). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

A bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (*Xcvi*) é capaz de sobreviver tanto em plantas sintomáticas como assintomáticas, de forma epifítica em órgãos de parte aérea de videiras, sob condições de umidade e temperaturas elevadas. Quando penetra nos tecidos de videiras pode colonizar os espaços intercelulares de maneira muito rápida e atingir o parênquima xilemático e vasos condutores do sistema vascular. A transmissão, dentro da área de cultivo, pode ocorrer rapidamente através de restos de cultura infectados espalhados pelo pomar ou aderidos em roupas, veículos, mas principalmente em contentores, tesouras, canivetes e luvas não desinfestadas utilizadas na colheita de frutos de plantas doentes, sendo sempre necessário a presença de água. A longa distância a disseminação ocorre principalmente através de mudas contaminadas, pois a bactéria pode aderir à superfície vegetal e ao encontrar um sítio favorável se estabilizar e sobreviver de forma epifítica até encontrar condições favoráveis para causar infecção. Os estudos realizados até o momento não elucidaram por completo as interações patógeno-hospedeiro. Por esse motivo, no presente estudo empregou-se o anticorpo policlonal AC4558 (Araujo, 2001; 2004) associado a técnicas de imunomarcagem, de microscopia ótica e eletrônica de varredura, para investigar novos potenciais nichos de colonização da bactéria. Através das fotomicrografias obtidas revelou-se que bagas da variedade Red Globe, mesmo assintomáticas, possuíam intensa colonização dos seus tecidos e sementes. Adicionalmente, observou-se desorganização avançada dos tecidos em sementes sintomáticas, sobretudo em área lesionada. A detecção de populações de *Xcvi* em bagas e sementes indicam mecanismo sistêmico de colonização dos diferentes tecidos e partes da videira. Ressalte-se ainda que, pela primeira vez, foi demonstrado, cabalmente, tecidos de sementes abrigando populações da bactéria, consolidando tais sítios como nichos de sobrevivência. Fatos que apontam para necessidade de inclusão de sementes em estudos de epidemiologia de *Xcvi*.

Palavras-chave: cancro da videira; disseminação; imunomarcagem; microscopia eletrônica de varredura.

ABSTRACT

TOSTES, Guilherme de Oliveira. **Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* in tissues of berries and seeds of grapes.** 2012. 95 pages. 2012. 94 pages. Dissertation (Master of Science in Crop Science/Plant Pathology). Agronomy Institute, Crop Science Department, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

The bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (*Xcvi*) is able to survive under epiphytic form in shoots of vines of both symptomatic and asymptomatic plants, under conditions of high humidity and temperatures. When it penetrates the tissues of grapevines they can colonize the intercellular spaces very quickly and reach the xylem parenchyma and conducting vessels of the vascular system. Transmission within the growing area occurs rapidly through infected crop residues around the orchard or attached to non-disinfected clothing and vehicles, but mainly in containers, scissors, knives and gloves used for harvesting diseased plants. Long distance dissemination occurs primarily through infected seedlings, because the bacteria can adhere to the plant surface and find a suitable place to establish and survive epiphytically until it can cause infection. The studies conducted so far did not completely elucidate the host-pathogen interactions. Therefore, in this study we used the polyclonal antibody AC4558 (Araujo, 2001, 2004) associated with immunostaining techniques, optical microscopy and scanning electron microscopy to investigate potential new niches for colonization of the bacteria. The photomicrographs showed that asymptomatic berries (cultivar Red Globe) had intense colonization of tissues and seeds. Additionally, there was disruption of the tissues in advanced symptomatic seeds, especially in the injured area. The detection of populations *Xcvi* in berries and seeds supports systemic mechanism of colonization of different tissues and parts of the grapevine. It should be noted that, for the first, it was demonstrated seed tissues harboring the bacteria populations, building sites such as niche survival. This findings suggest the need for inclusion of seeds in epidemiology studies of *Xcvi*.

Key words: bacterial canker of grapevine; dissemination; immunostaining, scanning electron microscopy.

1 INTRODUÇÃO

O grupo de bactérias *Xanthomonas* é muito diverso e está associado a inúmeras fitomoléstias provocando sérios prejuízos em diferentes culturas de importância econômica. Segundo Vandamme et al. (1996) este grupo de fitobactérias incide em centenas de espécies de plantas provocando os mais diferentes sintomas. Tal relato poderia levar ao entendimento que esse grupo seria generalista, ou seja, que um único patovar ocasionaria doença em inúmeras espécies de plantas, discussão polêmica entre os pesquisadores, haja vista que no passado cada espécie de *Xanthomonas* descrita em hospedeiro diferente recebia a denominação de um patovar novo (ROBBS & RODRIGUES NETO, 1993), situação que vem sendo mudada atualmente com novas normas propostas para nomeação de patovares (BULL et al., 2010). Sabe-se que determinada espécie de *Xanthomonas* pode ocasionar doença em plantas diferentes, mas de certa forma em um espectro de plantas pequeno, e os diferentes patovares apresentam suas especificidades, quanto ao hospedeiro bem como ao tecido vegetal atingido. Tal fato foi evidenciado por Ryan et al. (2011) que relataram, por exemplo, que *Xanthomonas vasicola* pv. *musacearum* incidem em musáceas, colonizando de forma sistêmica os vasos xilêmicos destes hospedeiros, outrora *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae* se aloca no mesófilo das brássicas onde provocam manchas foliares. Dessa forma, fica claro que a relação patógeno/hospedeiro pode ocorrer de maneira distinta quando se trata deste patógeno.

Representantes do gênero *Xanthomonas* podem mostrar-se específicos a determinados hospedeiros e tecidos, de modo que algumas espécies atacam monocotiledôneas e outras dicotiledôneas, mas ambas causando sérios impactos econômicos na agricultura. A especificidade que este patógeno apresenta a algumas plantas e tecidos permite evidenciar diferentes sintomas, pois podem colonizar toda a planta, invadindo os elementos do xilema do sistema vascular ou apenas espaços intercelulares dos tecidos do mesófilo foliar, no caso de espécies que promovem colonização localizada. Embora muitas espécies possam apresentar os dois tipos de colonização citados, como no caso de *Xanthomonas manihotis* em mandioca, que são capazes de colonizar tanto tecidos do mesófilo como vasculares, produzindo sintomas diversos (RYAN et al., 2011).

A colonização de algumas espécies de bactérias em diferentes partes da planta ganha importância no estudo do patossistema, pois sementes e estacas podem ser inóculo primário de doenças, tornando-se necessário conhecer a capacidade de sobrevivência, manutenção de poder infectivo e longevidade destes patógenos, para embasar a aplicação de medidas de controle adequadas (MARQUES et al., 2005).

Segundo Leben (1981), os mecanismos de sobrevivência das fitobactérias com as fases do seu ciclo de vida, podem ser patogênica, residente, latente, hipobiótica e saprofítica, constituindo-se em fonte de inóculo, sendo possíveis dois mecanismos de sobrevivência principais em associação ou não com a planta. No caso de associação biológica com hospedeiro, as bactérias podem ter sua longevidade aumentada, devido à disponibilidade de nutrientes e a proteção oferecida pela planta hospedeira contra fatores desfavoráveis do ambiente.

Casos de *Xanthomonas* spp., associadas a sementes são rotineiramente citados tais como: *X. campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de tomateiro (BASHAN e ASSOULINE, 1983), *X. campestris* pv. *campestris* em brássicas (FRANKEN, 1992) e *X. phaseoli* (AGRIOS, 2005). Esta associação pode favorecer a disseminação de bactéria a longas distâncias.

Já dentro da área de cultivo, as bactérias podem ser disseminadas planta a planta através de práticas agrícolas, água da chuva e irrigação, solo contaminado e também por insetos (AGRIOS, 2005).

Tratando-se do patossistema cancro bacteriano da videira causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (*Xcvi*), observou-se que a bactéria sobrevive tanto em plantas sintomáticas como assintomáticas, de forma epifítica em órgãos de parte aérea, sob condições de umidade e temperaturas elevadas (ARAÚJO, 2001).

Segundo Trindade et al. (2004) a ausência de condições ambientais favoráveis podem ter prevenido expansão dessa bacteriose e evitando a ocorrência de uma epidemia, fato este observado apenas em 1998 e a hipótese de esta bactéria ter sido introduzida por outros hospedeiros de elevado potencial como a manga e o neem (*Azadirachta indica*) também já foi descartada, pois atualmente sabe-se que a doença foi introduzida no Brasil através de mudas de videira contaminadas. Todavia, hospedeiros alternativos no parreiral e proximidades podem ser potenciais meios de disseminação da bactéria entre as quais citam Peixoto et al. (2007) as plantas *Alternanthera tenella*, *Amaranthus* sp., *Glycine* sp., *Senna obtusifolia*, *Chamaesyce hirta*, *Dactyloctenium aegyptium*, *Eragrostis pilosa* e *Pilea* sp.

A curtas distâncias a transmissão do cancro bacteriano ocorre rapidamente através de restos de cultura infectados espalhados pelo pomar ou aderidos em roupas, veículos, mas principalmente em contentores, tesouras, canivetes e luvas não desinfestadas utilizadas na colheita de frutos de plantas doentes. O vento por si só não atuaria como disseminador da doença, sendo necessária a presença de água, o que leva o período chuvoso, ser a época de maior incidência da doença (Nascimento & Mariano, 2004).

Estudos de interações de *Xcvi* com seu hospedeiro natural foram realizados por Araujo (2001) em material sintomático, utilizando microscopia eletrônica de varredura, o autor concluiu que as células bacterianas aderem randomicamente às superfícies vegetais por meio de fixação apolar em monocamada, raramente formando agregados, e que maior frequência dessa adesão ocorre sobre nervuras e tricomas, no limbo foliar. Após atingir um sítio favorável *Xcvi*, consegue resistir à remoção sendo essa uma vantagem seletiva, responsável pelo aumento e estabilidade da população residente (Araujo, 2001; Nascimento & Mariano, 2004). Araujo et al. (2004) utilizando materiais sintomáticos e assintomáticos de videira verificaram a ocorrência de intensa colonização de *Xcvi*. Nos espaços intercelulares de maneira muito rápida atingindo o parênquima xilemático e vasos condutores do sistema vascular, sendo a partir daí transmitida a outros órgãos da planta.

Tais estudos citados ajudaram na compreensão das interações patógeno-hospedeiro, no entanto nem todos os órgãos da planta foram analisados, como, por exemplo, frutos, sementes e engaços. Dessa forma, pretendeu-se investigar potenciais nichos de colonização da bactéria em tecidos de baga e sementes, por meio de técnicas de imunomarcagem associada à microscopia ótica e eletrônica de varredura, além de avaliar a possível presença de *Xcvi* em frutos assintomáticos oriundos de áreas endêmicas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparo de amostras para microscopia ótica

Amostras de engaço e sementes de videira foram seccionadas em segmentos de 0,5 a 1,0 cm de comprimento por 0,1 a 0,5 cm². Os segmentos foram lavados duas vezes em solução tampão fosfato 50 mM, pH 6,8 e fixadas em solução de glutaraldeído 2,5 % em tampão fosfato por 24 horas a temperatura ambiente (fixação primária). As amostras foram preparadas para microscopia ótica de acordo com James et al. (1994), com pequenas modificações. Após a fixação primária, as amostras foram lavadas por três vezes em tampão fosfato para remoção do glutaraldeído residual e desidratadas em série etanólica crescente (15, 30, 50, 60, 70, 80, 90, 100 % etanol em água v/v), permanecendo por 15 minutos em cada solução. Em seguida as amostras foram embebidas em resina acrílica “LR White medium grade” (London Resin Company, UK) durante um período de sete dias, sendo mantidas em geladeira para infiltração da resina. Subsequentemente, amostras individuais foram cuidadosamente transferidas com pinça fina para cápsulas transparentes de gelatina contendo resina, orientadas para obtenção de cortes transversais, longitudinais ou paradérmicos e postas a polimerizar em estufa a 60 °C por um período de 18 horas. As cápsulas polimerizadas foram selecionadas, levadas a lupa do ultramicrotomo e lapidadas a mão utilizando lâmina de aço para obtenção de blocos de forma trapezoidal contendo a amostra. A partir destes blocos foram obtidas seções semi-finas (0,7 - 1 µm) utilizando um ultramicrotomo Reichert-Jung Ultracut E e facas de vidro preparadas em um Knife maker II Reichert-Jung. Seções semi-finas para observação ao microscópio ótico foram coletadas em lâminas de vidro contendo uma gota de água, fixadas em placa metálica aquecida e imediatamente coradas com azul de toluidina solução 0,1% preparada a partir de uma solução contendo 1% de azul de toluidina e 1% de tetraborato de sódio (bórax) aquosa, sendo então examinadas em um microscópio ótico.

2.2 Preparo de amostras para microscopia eletrônica de varredura

Amostras também foram processadas e fixadas em glutaraldeído (2,5%) em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0), lavadas no mesmo tampão por três vezes a intervalos de 10 min e, em seguida, pós-fixadas em solução aquosa de tetróxido de ósmio (1%). A seguir, as amostras foram lavadas novamente por três vezes em tampão fosfato, conforma descrito acima e desidratadas em série acetônica crescente (30, 50, 70, 90, 100 % de acetona em água). Em seguida, amostras selecionadas foram transferidas para o equipamento “Critical Point Drying Apparatus” (Mod. CPD 030, Bal-tec), pelo qual se efetuou a secagem completa das amostras mediante substituição da acetona por gás carbônico líquido mantido a alta pressão. Posteriormente, transformou-se o CO₂ líquido em CO₂ gasoso pela aplicação de uma temperatura de 36 °C e pressão de 70 atm (ponto crítico de secagem para o CO₂). Após este procedimento, as amostras foram cobertas com uma película de ouro visando aumentar a condutividade eletrônica, aplicando-se uma corrente de 18 mA e tempo de deposição de ouro de 240 segundos, através do “Automatic Sputter Coater” (Mod. SCD 050, Bal-tec), o qual fornece, em teoria, uma cobertura em torno de 300 nm de espessura. Finalizado o procedimento, as amostras foram examinadas ao microscópio eletrônico de varredura (Zeiss) DSEM 962.

2.3 Validação do anticorpo AC 4558, para posterior utilização na imunomarcação

O anticorpo policlonal AC4558 produzido e testado por Araújo (2001) e Araújo et al. (2004), a partir de isolados brasileiros de *Xcvi*, teve sua eficiência aferida através de teste Elisa (“Enzyme-Linked Immunosorbant Assay”), utilizando-se as estirpes de *Xcvi* ENA 4558, 4598 e 4600, tendo como controle negativo *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* ENA 4480, e poços impregnados apenas com Orthophenylenediamine (OPD).

Foi adotado o teste ELISA indireto, conforme proposto por Levanony et al. (1987), com adaptações realizadas por Reis et al. (1997). Estirpes bacterianas foram cultivadas em meio DYGS, a 30 °C, por 24 h, sob agitação (150 rpm), seguido de centrifugação de alíquotas de 1ml a 2000 g por 3 min. e ressuspensão em 1 ml de tampão carbonato-bicarbonato 50 mM - pH 9,6. Em seguida, foram feitos ajustes das concentrações dos antígenos para uma densidade ótica (D.O.) de $1,0 \pm 0,1$, lida em comprimento de onda $\lambda = 436$ nm. Os poços das placas de ELISA foram então impregnados com 50 μ l dos antígenos calibrados, seguindo-se incubação a 4°C por 16 a 18h. Decorrido esse período, os poços foram lavados com solução tampão PBS [(g.l⁻¹): NaCl - 8,0; KCl - 0,2; Na₂HPO₄. 2H₂O - 1,4; KH₂PO₄ - 0,2 + 0,05% Tween 20 + 0,5% BSA], sendo as reações inespecíficas bloqueadas utilizando-se solução de soro albumina bovina (3% em PBS) por 30 min a 37 °C. Foram adicionados 50 μ l do anticorpo por poço, incubando-se as placas por mais 30 min a 37 °C. A seguir, foram procedidas três lavagens com 200 μ l de solução por poço. Foram então aplicados 50 μ l de anticorpo secundário (imunoglobulinas IgG de cabra, conjugadas com peroxidases produzidas contra imunoglobulinas de coelho) diluído na proporção de 1:1000 em PBS, seguido de incubação por 45 min a 37 °C, tratando-se os poços com solução de lavagem por cinco vezes. Por fim, foram adicionados 100 μ l de Signal ABTS, sendo as leituras de absorbância, após desenvolvimento da reação, realizadas em espectrofotômetro Labsystem Multiskan Plus (Labssystem Oy, Helsinki, Finlândia), dotado de filtro de interferência de 405 nm. Os dados foram armazenados e processados pelo programa Labsystems Transmit Multskan Plus for Windows.

Os controles foram obtidos com poços preenchidos com soro pré-imune, sem o anticorpo primário, sem o anticorpo secundário, sem antígeno, somente com o substrato diretamente na placa. Previamente à incubação, as placas foram agitadas a 300rpm por 3 min, em agitador IKA-Schuttler MTS 2 (Janke & Kunkel GmbH & Co KG IKA-Labortechnik Staufen, Alemanha). Durante o tempo de reação do substrato com a enzima, as placas foram agitadas a 100 rpm.

2.4 Imunomarcação com partículas de ouro para microscopia ótica

Seções semi-finas de tecidos (0,7-1 μ m), não osmificadas, obtidas no ultramicrotomo, foram colocadas em uma gota de água sobre lâminas de microscópio, cobertas com solução de gelatina 1% em água e fixadas a temperatura em torno de 40 °C. As lâminas contendo os cortes foram então colocadas em câmara úmida, sendo cobertas por solução de bloqueio IGL por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, após rápida lavagem em água, foi aplicado o antissoro primário (AC4558, AC4560 e os ambos não purificados), diluído a 1:500, e o material incubado em câmara úmida por 1 hora a 25 °C. Utilizando boxes de vidro, as seções foram então lavadas em solução de lavagem (1% Tween 20 em PBS) e água destilada e esterilizada (5 minutos em cada) e secas com papel absorvente. Em seguida, foram aplicados 40-50 μ l de anticorpo secundário conjugado com partículas de ouro de 1 nm de diâmetro, diluído a 1:100 em solução IGL por um período de 4 horas a temperatura variando de 20 a 25 °C, sob

câmara úmida. Decorrido esse período as lâminas foram novamente lavadas em solução de lavagem e água destilada e esterilizada por mais 5 minutos e postas para secar, encerrando-se assim o processo de imunomarcção. Para visualização ao microscópio ótico, marcaram-se as partículas de ouro com prata, utilizando o kit Intense SE BL Silver Enhancement (Laboratory Janssen Life Sciences Products), de acordo com o método descrito por Vanderbosh et al., (1986). A reação foi então visualizada pela deposição de um precipitado preto opaco ao redor das partículas de ouro conjugadas ao anticorpo secundário.

2.5 Potencial de disseminação de *Xcvi* através dos frutos

Com o intuito de investigar a eficiência de sobrevivência de *Xcvi* em bagas de uvas assintomáticas, foram coletadas amostras de uvas em diferentes redes de supermercados (Figura 11) do Estado do Rio de Janeiro, ao longo dos meses de novembro de 2010 a dezembro de 2011 totalizando 50 amostras distintas, de lotes oriundos dos estados de Pernambuco e da Bahia, sabidamente de ocorrência da bacteriose, e de outros estados viticultores tais como Minas Gerais, São Paulo, Paraná (Figura 12). Após as coletas, foram realizadas tentativas de isolamento de *Xcvi* a partir das bagas e sementes, seguidas de preparação de amostras para observações microscópicas.



Figura 11. Amostras de uvas de variedades e origens diversas, coletadas em pontos de venda no Rio de Janeiro.

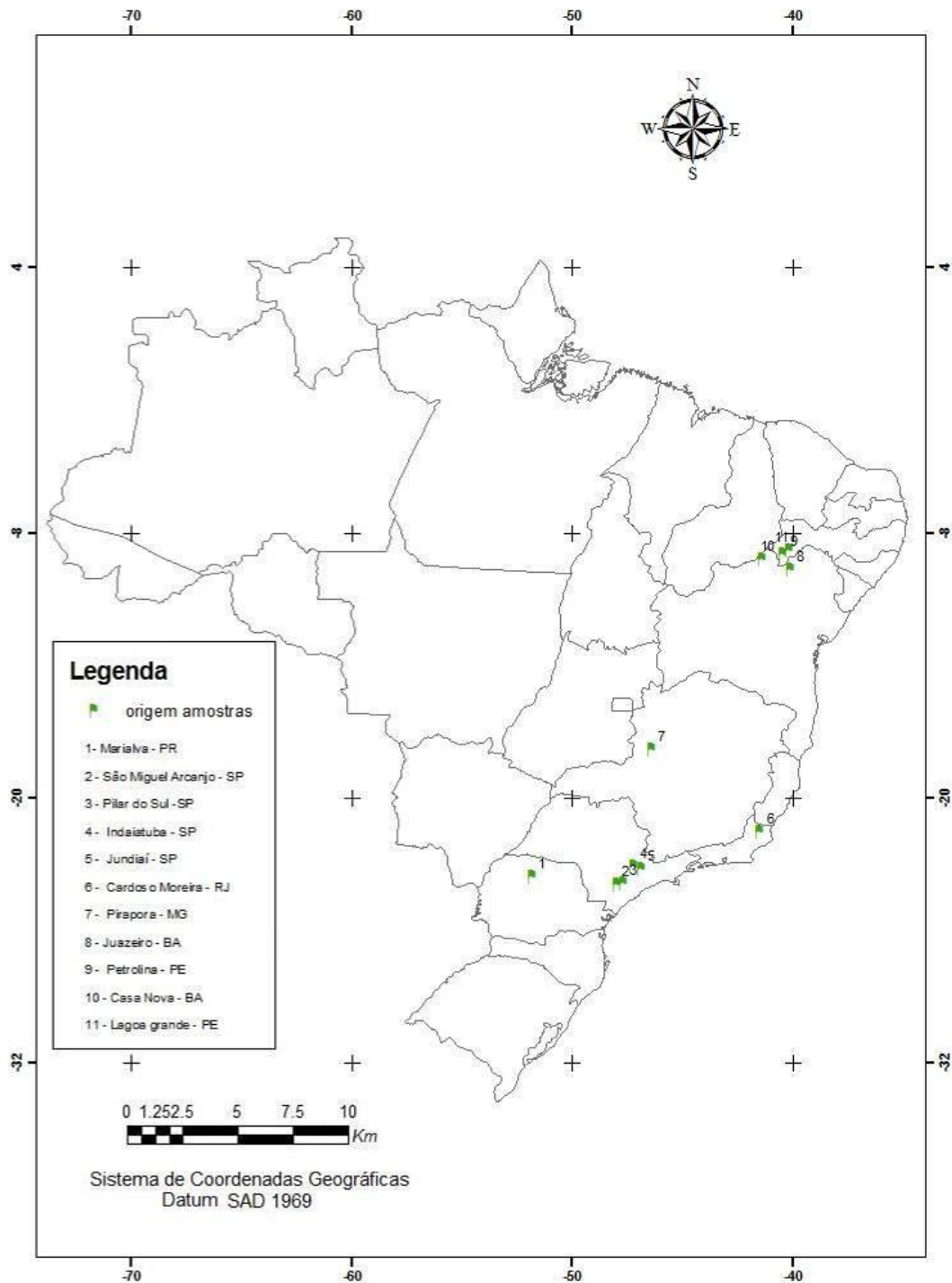


Figura 12. Cidades de origem das bagas de videiras coletados em comércio varejista do Estado do Rio de Janeiro e submetidos a tentativas de isolamento de *Xcvi*.

Bagas foram retiradas das amostras, de forma aleatória, com o intuito de detectar *Xcvi* na sua superfície, tecidos e sementes. Nesse sentido, as bagas foram higienizadas com ADE e depositadas em tubos contendo 15 ml de ADE, sendo, em seguida, submetidas à rotação de 500 rpm por 10 min., em agitador orbital. Em continuidade alíquotas de 0,1 ml foram riscadas em meio de cultivo semi-seletivo NYDAM (PEIXOTO et al., 2006) e incubadas por 48h a 28 °C. Já as sementes foram extraídas e submetidas ao mesmo processo, sendo o volume de ADE reduzido para 2 ml.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos de microscopia eletrônica de varredura revelaram que as amostras sintomáticas ou assintomáticas da variedade Red Globe oriundas de áreas produtoras onde ocorre *Xcvi*, possuíam engaço com intensa colonização de *Xcvi* nos tecidos superficiais (Figura 13 A, B, C e D).

De forma generalizada, os tecidos encontravam-se com integridade celular comprometida, semelhante ao que já havia sido relatado por Araujo et al. (2004) ao examinarem tecidos internos de folhas, ramos e pecíolos e evidenciarem que a bacteriose promove perda da integridade celular (Figura 13 e 14).

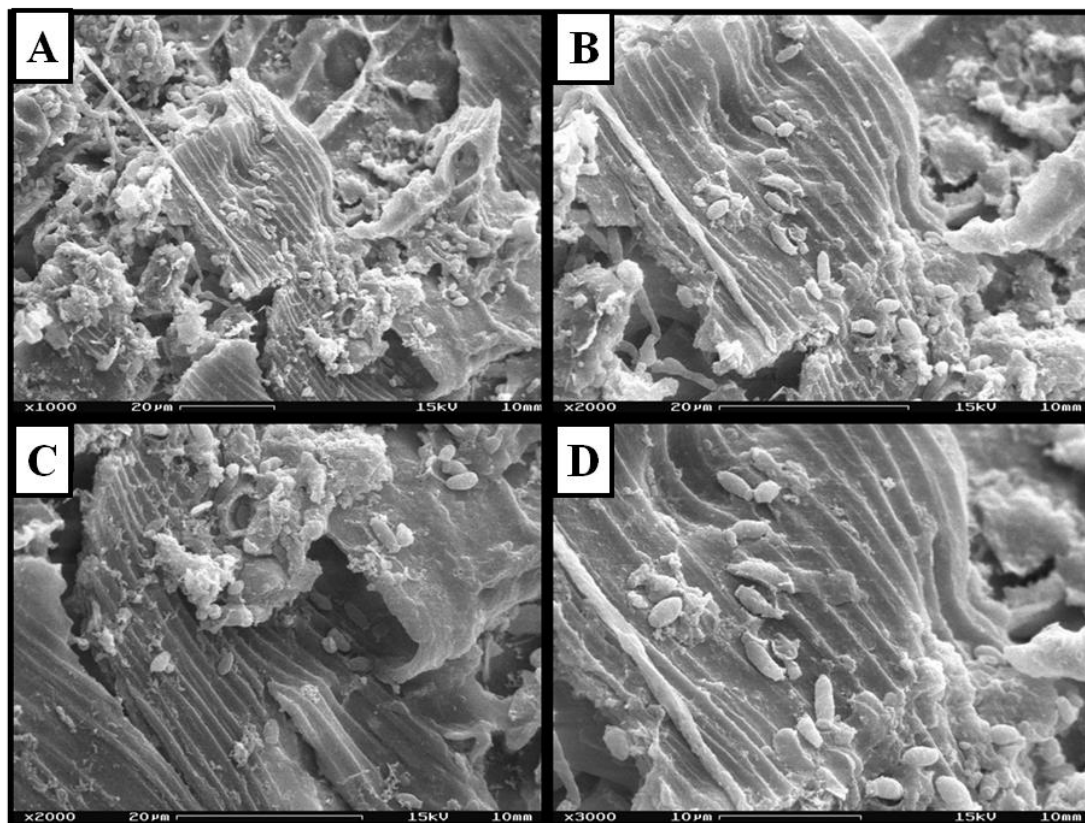


Figura 13. A e B) Fotomicrografias de pedicelo ligado a baga de uva da variedade Red Globe apresentando degeneração do tecido ocasionado por *Xcvi*; C e D) *Xcvi* aderida ao tecido epitelial do engaço.

Observou-se maior destruição dos tecidos em sementes sintomáticas (Figura 14 A, B, C e D), com intensa colonização de toda a área lesionada, resultando em massas densas de células bacterianas nesses nichos (Figura 14 E e F). Provavelmente, essas áreas constituem sítios eficazes de sobrevivência desta bactéria.

Os exames das fotomicrografias de tecidos assintomáticos indicam que o início da colonização da semente (Figura 15 A e B) pode ocorrer a partir da região de ligação do fruto a planta a través do engaço (Figura 15 C e D). Nesses tecidos nota-se que a colonização também ocorre de forma intensa, e sintomas iniciais de degeneração celular, conforme mostrado na figura (Figura 15 E e F).

A porta de entrada da bactéria no fruto, por sua vez, pode ser através de processo sistêmico, visto que Araujo et al. (2004) observaram que esta bactéria estava presente no pedicelo, elo de ligação da planta bem como no fruto.

A sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em tecidos de videira sintomáticos e assintomáticos evidenciam que populações epífitas são fontes de inóculo, inclusive nos períodos do ano desfavoráveis à ocorrência de novas infecções (Araujo et al., 2004). No caso de sementes, tal constatação traduz-se em maior relevância, haja vista que os frutos são partes comercializadas, podendo resultar em meio de disseminação desta bactéria.

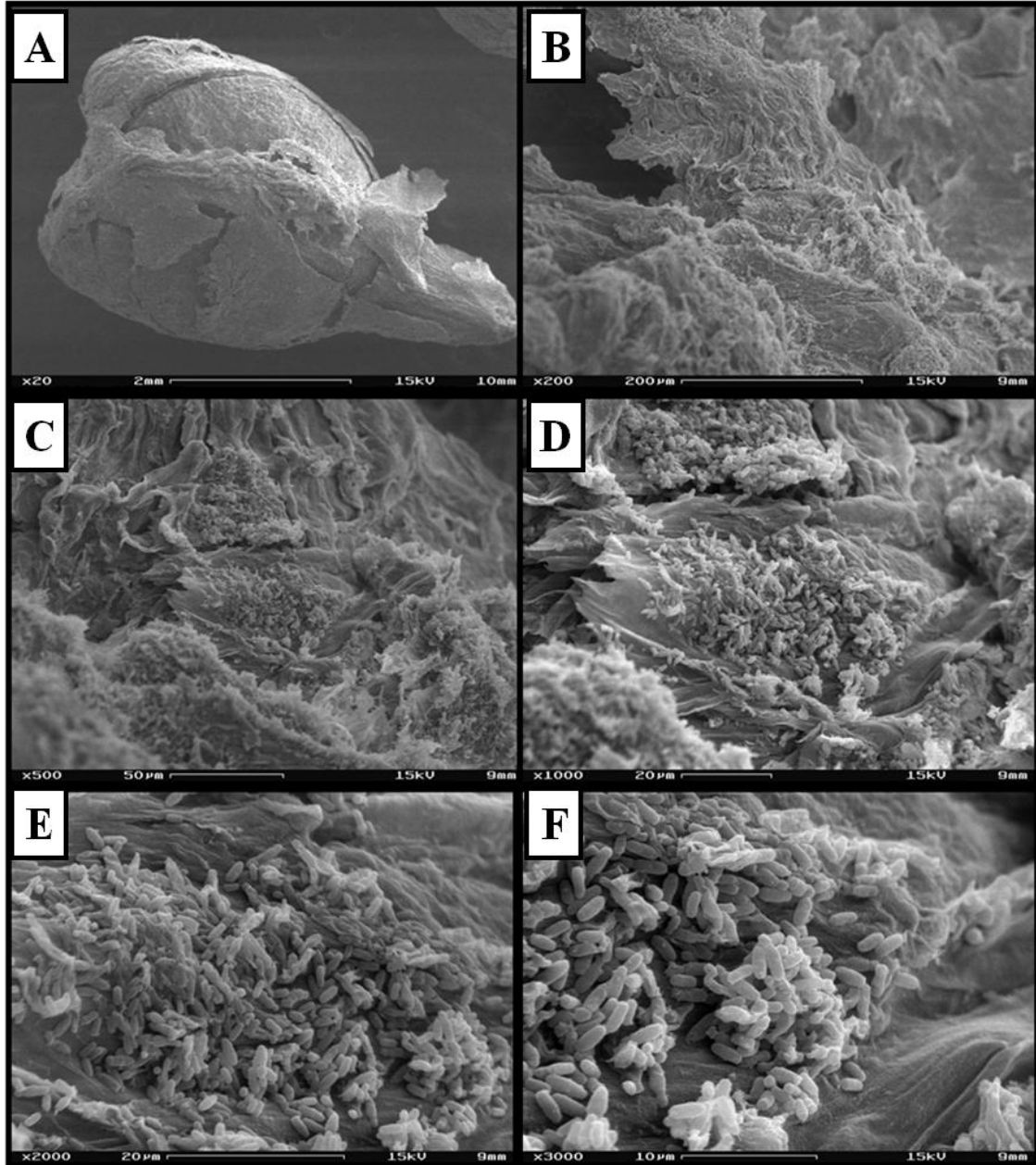


Figura 14. A) Fotomicrografias de semente de uva variedade Red Globe apresentando sintomas de cancro e desprendimento do tecido epitelial; B) Desorganização celular e comprometimento do tecido externo da semente; C) e D) Massas de células bacterianas colonizando extensa área do tecido lesionado promovendo intensa infecção; E) e F) Notar massa formada por células baciliformes característica morfológica de *Xcv*.

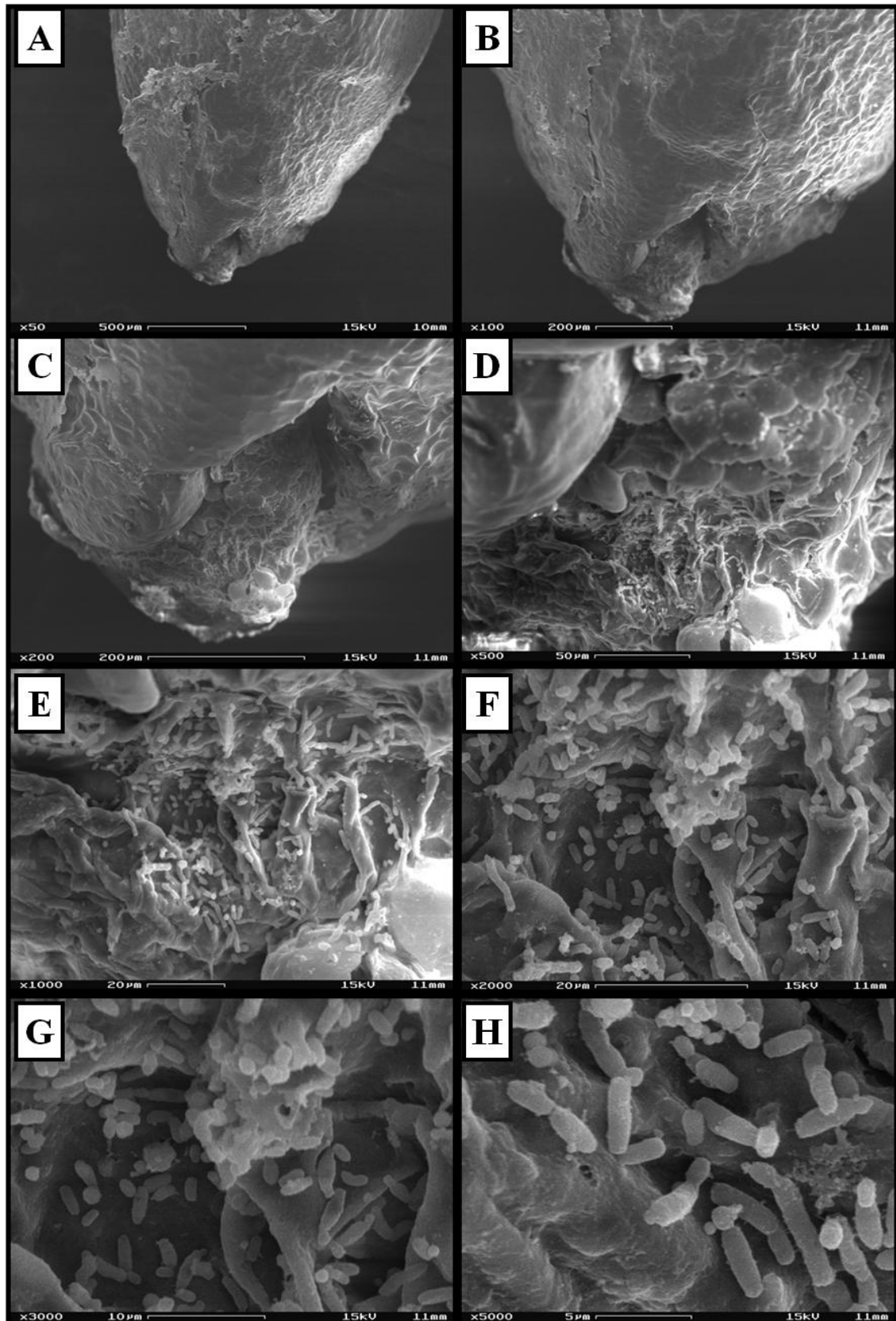


Figura 15. Fotomicrografias de semente de uva variedade Red Globe assintomáticas; A e B) Evidência a ausência de sintomas; C e D) Elo de ligação da semente com pecíolo; E e F) Células de *Xcvi* promovendo intensa colonização na cavidade interna de semente onde se fixa o pecíolo, indicando a característica sistêmica desta bactéria; G e H) Sintomas iniciais de degeneração celular do tecido.

Doenças bacterianas associadas às sementes continuam sendo problema, causando perdas econômicas significativas, pois são responsáveis pela re-emergência de doenças através de fronteiras ou na introdução de doenças em novas áreas (GITAITIS e WALCOTT, 2007). Segundo Darrasse et al. (2010) sementes são portadores passivos de uma flora microbiana diversificada capaz de afetar a fisiologia de plântulas e o transporte de sementes favorece a disseminação. Esses autores verificaram transmissão de bactérias a partir de flores para sementes e das sementes para plântulas de feijão de *X. campestris* pv. *campestris*, por *X. citri* pv. *phaseoli* var. *fuscans* e de *Escherichia coli*, em interações com nódulos de feijão. Eles também observaram que quando as flores foram inoculadas aumentou-se o nível de contaminação de sementes de feijão, transmitindo para mudas, evidenciando a importância de sementes como uma fonte de inóculo.

Apesar da videira não ser, comercialmente propagada por sementes, a maioria das cultivares comerciais as possui, sendo, portanto deslocadas de uma região para outra juntamente com as bagas comercializadas, podendo servir de meio de disseminação da bactéria para outras áreas.

Outra ferramenta utilizada neste trabalho foi a imunomarcação que foi precedida de ensaios sorológicos, para comprovação da eficiência do anticorpo. Nessa fase do trabalho valores de leitura de densidade ótica analisados através do testes de médias Tukey (Figura 16), indicaram alta reatividade do soro AC 4558 frente às diferentes estirpes de *Xcvi* ENA 4562, 4598 e 4600, pois não apresentaram diferenças significativas a nível de 5% de probabilidade, no entanto diferiram do controle e da estirpe ENA 4480 *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*, informação que corrobora com resultados apresentados por Araujo (2001) e Araujo et al. (2005) certificando então a afinidade do anticorpo ao antígeno específico *Xcvi*.

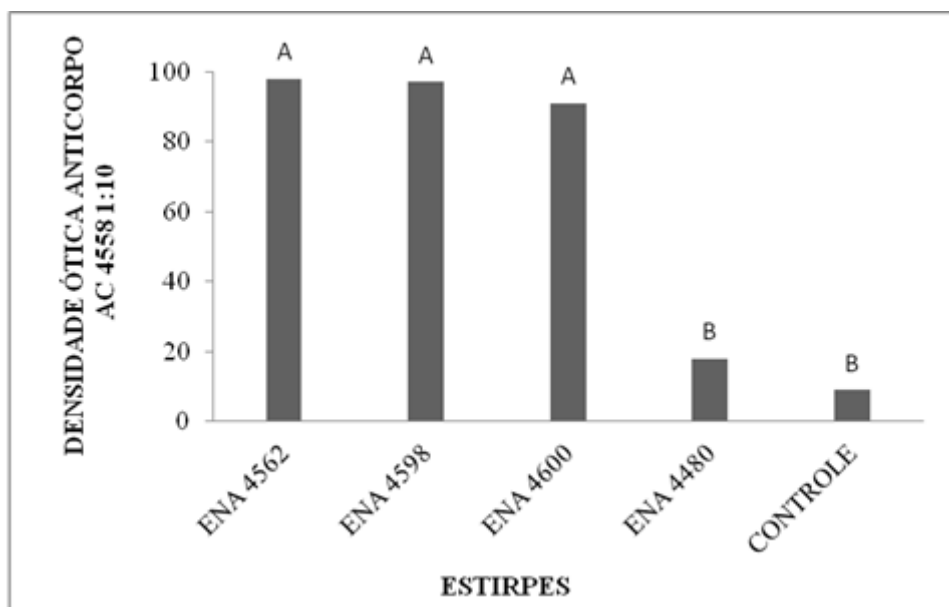


Figura 16. Avaliação da efetividade do anticorpo policlonal AC 4558 frente a diferentes estirpes de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (ENA 4562, 4598 e 4600) e a *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* (ENA 4480) pelo método Elisa, através do teste Tukey a nível de 5% de probabilidade de erro. Letras iguais traduzem-se em não significância estatística entre as médias de leitura de densidade ótica.

Após a validação do anticorpo a identidade das células bacterianas observadas nas fotomicrografias, foi confirmada através da imunomarcção das células de *Xcvi*. A Figura 17A, foi esquematizada a reação bioquímica de imunomarcção, enquanto na Figura 17B é possível visualizar a formação de precipitado escuro formado pelas partículas de prata ao aderirem ao anticorpo secundário que por sua vez está acoplado ao primário que se ligou ao epítipo dos antígenos devido a sua afinidade aos mesmos.

A Figura 18 A,B,C e D apresentam as divisões anatômicas da semente de uva, já na Figura 18 G e H é possível novamente observar a eficiência da reação de imunomarcção quando comparada com as Figuras 18 E e F, controles. Além disso, na Figura 18 G e H, fica evidente a colonização interna da semente sendo esse também um nicho de sobrevivência de *Xcvi*.

Resultados positivos das tentativas de isolamento de *Xcvi* em uvas *in natura*, embora preliminares, indicam a capacidade efetiva de sobrevivência da bactéria, pois foi possível obter cultura pura, tanto de bagas quanto das sementes, a partir de amostras provenientes das áreas endêmicas da bacteriose, especificamente Bahia e Pernambuco, onde oito das vinte amostras foram positivas a *Xcvi* (Figura 19). Constatação que também merece atenção urgente dos pesquisadores, de sorte a restringir o avanço do cancro bacteriano da videira em nosso país. Por outro lado, em nenhuma das 30 amostras oriundas da região Sudeste e Sul foi possível isolar *Xcvi* indicando que a praga ainda encontra-se restrita ao Nordeste.

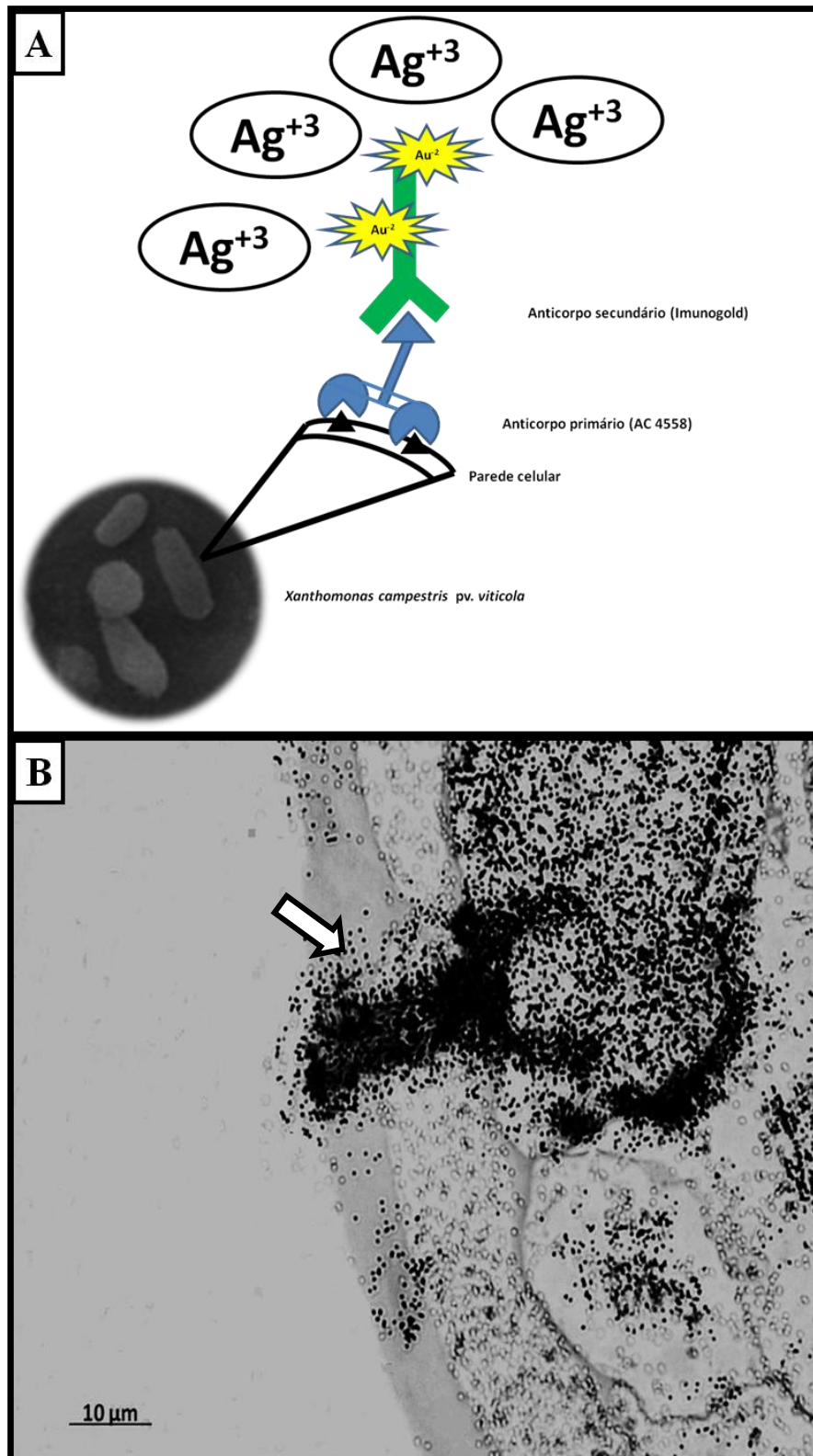


Figura 17. A) Esquema ilustrativo da reação bioquímica de imunomarcção; B) Fotomicrografia ótica de campo claro corte longitudinal de semente de uva da variedade Red Globe, onde é possível observar a formação de precipitado negro ocasionado pela adesão das partículas de prata ao anticorpo primário. Observar exsudação (Seta) indicando células de *Xcvi* saindo da área interna ao tegumento em direção a parte externa do tegumento através de uma cavidade.

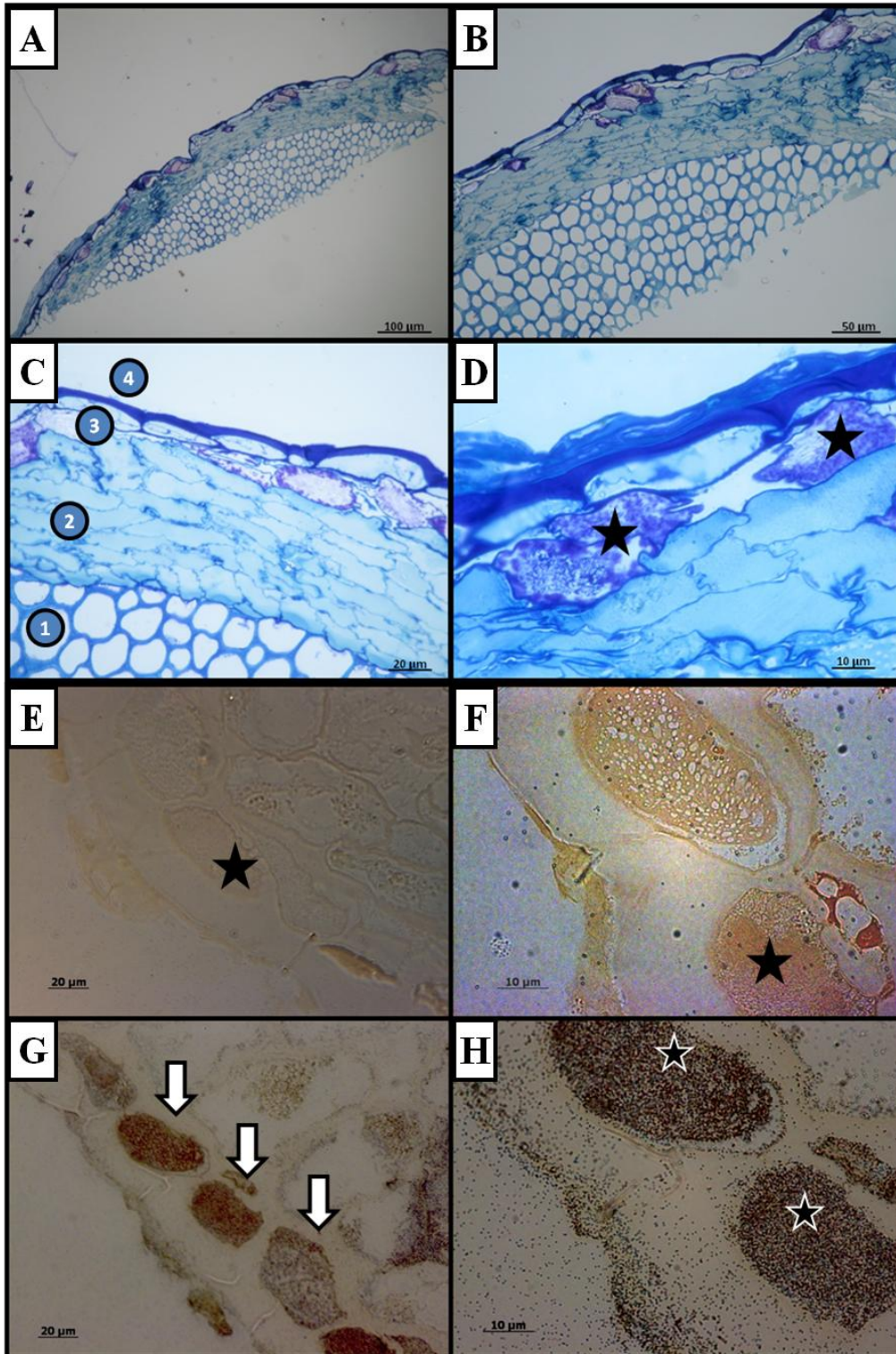


Figura 18. A e B) Fotomicrografia ótica de campo claro de corte transversal de semente assintomática de uva da variedade Red Globe, colorida com azul de tolúidina 1%, onde é possível notar a integridade dos tecidos; C) 1- Parênquima, 2 - Endosperma, 3 - Espaço interno entre o Endosperma e o tegumento, 4 - Tegumento; D) Detalhe do corante metacromático reagindo com células bacterianas e assumindo cor arroxeadas; F e G) Controle negativo no ensaio de imunomarcagem no detalhe ausência de formação de precipitado negro local onde se aloca *Xcvi*; H e I) Reação de imunomarcagem positiva e no detalhe ponto de alocação de *Xcvi* no tecido interno da semente.

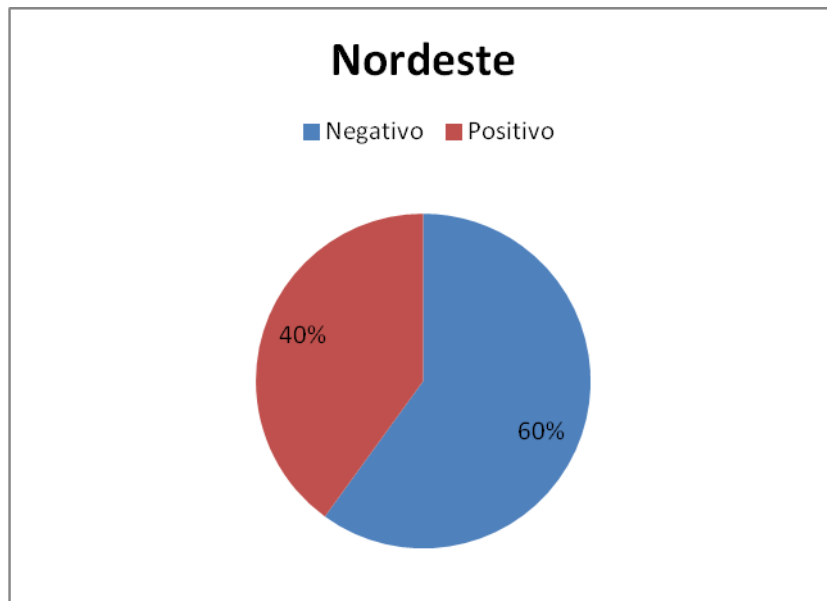


Figura 19. Percentagem de amostras de uvas de diferentes variedades oriundas do Nordeste, contaminadas com *Xcvi*.

4 CONCLUSÕES

1. *Xcvi* sobrevive na superfície da baga e na semente de uva, mesmo assintomática;
2. A imunodeteção de populações de *Xcvi* em bagas e sementes, assintomáticas e sintomáticas, sustenta mecanismo sistêmico de colonização dos diferentes tecidos e partes da videira e;
3. A constatação de populações de *Xcvi* associadas às sementes traduz-se em maior relevância e contribui para elucidação, das interações patógeno-hospedeiro.

CAPÍTULO III

EVOLUÇÃO DA RESISTÊNCIA DE *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* AOS PRINCIPAIS AGROQUÍMICOS EMPREGADOS NO MANEJO DO CANCRO BACTERIANO DA VIDEIRA

RESUMO

TOSTES, Guilherme de Oliveira. **Evolução da resistência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* aos principais agroquímicos empregados no manejo do cancro bacteriano da videira.** 2012. 94 páginas. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia com ênfase Fitossanidade). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Agroquímicos cúpricos são amplamente empregados no manejo integrado de fitobacterioses, porém o desenvolvimento de populações bacterianas resistentes a tais produtos podem inviabilizar sua utilização. Quanto a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (*Xcvi*) não existem estudos conclusivos quanto ao efeito destes produtos ou mesmo da mistura de sulfato de cobre + mancozeb no controle desta bactéria. Além disso, não existem ainda, defensivos agrícolas específicos registrados para o controle químico deste patógeno. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar *in vitro* os efeitos destes agroquímicos sob estirpes de *Xcvi* isoladas em diferentes épocas, da mesorregião brasileira, onde correram os primeiros relatos do cancro bacteriano da videira. Diferentes estirpes foram crescidas em meio NA por 48h a 28°C e suspensões foram padronizadas na concentração de 10⁸ ufc/ml, em seguida foram expostas a concentrações crescentes (0; 50; 100; 150; 200; 250; 300 e 1000µg/ml) dos princípios ativos sulfato de cobre, mancozeb e a mistura sulfato de cobre + mancozeb por uma hora e semeadas em placas de Petri. A resistência de cada estirpe foi avaliada após 72h de incubação a 28°C, através da contagem do número de colônias crescida nas placas. Os ensaios foram organizados em delineamento inteiramente casualizado fatorial 3x3, contando com três repetições onde, cada uma, era uma placa. A eficiência dos produtos foi avaliada, através dos testes de média Tukey e Scott-Knott. Os resultados demonstraram que estirpes de *Xcvi* podem expressar resistência *in vitro* a concentrações de até 50, 250 e 1000 mg/ml de sulfato de cobre + mancozeb, de sulfato de cobre, e mancozeb, respectivamente, comprovando o efeito sinérgico da mistura sulfato de cobre + mancozeb. Além disso, o estudo indicou a co-evolução de estirpes da espécie quanto à resistência *in vitro* aos principais bactericidas empregados no manejo do cancro bacteriano da videira e aponta para necessidade de novos estudos a nível molecular de modo a elucidar esse fenômeno e alicerçar medidas de controle.

Palavras-chave: manejo químico; sulfato de cobre; mancozeb; efeito sinérgico.

ABSTRACT

TOSTES, Guilherme de Oliveira. **Evolution of resistance *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* agrochemicals employees to major in management of canker of bacterial vine**. 2012. 95 pages. 2012. 94 pages. Dissertation (Master of Science in Crop Science/Plant Pathology).Agronomy Institute, Crop Science Department, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Agrochemicals containing copper are widely used in integrated management of bacterial diseases of plants, but the development of resistant bacterial populations to such products, may prevent its use. As for *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (*Xcvi*) no conclusive studies exist on the effect of copper sulphate or the mixture of copper sulphate + mancozeb the control of the bacterium. In addition, there are not specific pesticides registered for the chemical control of this pathogen. Thus, this research studied the *in vitro* effects of agrochemicals on *Xcvi* strains isolated at different seasons from the Brazilian Northeast, where bacterial canker of grapevine occurs. Different strains were grown in NA medium at 28°C for 48h from suspensions standardized at 108 cfu / ml concentration, and then exposed to increasing concentrations (0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, and 1000µg/ml) of active principles copper sulfate, mancozeb and the mixture of copper sulphate + mancozeb for one hour and plated on petri dishes. The resistance of each strain was measured after 72h incubation at 28°C by counting the number of colonies grown on the plates. The assays were organized in a completely randomized 3x3 factorial, with three replications, where each one was a plate. The efficiency of the products was evaluated through the mean tests and Tukey Scott - Knott. The results demonstrated that strains can express *Xcvi* resistance *in vitro* at concentrations of 50, 250 and 1000 mg / ml mancozeb + copper sulfate, copper sulfate, and mancozeb, respectively, confirming the synergistic effect of the mixture of copper sulphate + mancozeb. Furthermore, the study indicated the co-evolution of strains of *Xcvi* for resistance to bactericidal employees in the management of bacterial canker of grapevine and indicated the need for further studies at the molecular level in order to elucidate this phenomenon.

Key words: chemical management, copper sulfate, mancozeb, synergistic effect.

1 INTRODUÇÃO

O primeiro relato da utilização de produtos cúpricos na agricultura ocorreu em 1885, com a descoberta e utilização da calda bordalesa pelo Fitopatologista Pierre-Marie Alexist Millardet, na viticultura francesa, evento tal que evitou o colapso dos vinhedos daquele país (MOURA, 2002). Desde então tais produtos vem sendo empregados nas mais diferentes culturas como forma de controle químico de fitomoléstias de etiologia fúngica ou mesmo bacterianas, pois apresentam alta toxicidade aos fitopatógenos, baixo custo e efeito tóxico reduzido em mamíferos, o que os tornam viáveis economicamente e adequados à agricultura (CHA & COOKSEY, 1991). Todavia, o uso contínuo e indiscriminado, associado à pressão de seleção, pode favorecer mutações genéticas e o surgimento de populações bacterianas resistentes a tais agroquímicos (STALL et al., 1986; RAMOS & ROSATO, 1996; AGUIAR et al. 2000; MARQUES et al., 2009; BEHLAU et al., 2011).

Presente nas células eucarióticas e procarióticas, o cobre atua como elemento essencial ao funcionamento normal das células participando de inúmeras reações bioquímicas. Dessa forma, é requerido por várias enzimas, como as oxigenases e proteínas de transporte de elétrons, que estão envolvidas nos processos respiratórios desses organismos. No entanto, quando em concentrações elevadas promovem a formação de radicais livres que são altamente reativos e podem comprometer a estrutura de membranas lipídicas e DNA, sendo, portanto, em tal situação tóxico às células. Por isso, as bactérias ao longo da evolução vêm desenvolvendo mecanismos que tentam controlar a entrada e saída desse íon na célula, de modo a manter em seu interior apenas o mínimo para suas necessidades, protegendo suas organelas de concentrações excessivas que possam desnaturá-las suas organelas (VOLOUDAKIS et al., 2005).

Os principais artifícios usados pelas células procariotas na regulação do cobre são relatados por Summers & Silver (1978) dentre os quais citam a exclusão através de vias diversas, o acúmulo em vacúolos e detoxificação promovida por reações enzimáticas. Segundo Marques, (2007), tais mecanismos podem atuar de maneira sinérgica e permitir que bactérias sejam resistentes ao cobre, refletindo na ineficácia do controle químico desses organismos no campo, fato que leva agricultores a procurarem alternativas de controle.

Os primeiros estudos relacionados à resistência de fitobactérias ao cobre foram apresentados por Marco & Stall (1983), que comprovaram que entre o período de 1960 a 1980, quase todos os isolados de *X. campestris* pv. *vesicatoria* provenientes de cultivos de pimentão na Flórida manifestavam resistência ao cobre. Desde então, este assunto vem sendo explorado em diferentes formas.

Ainda na década de 80, Stall et al. (1986) conseguiram identificar um plasmídeo denominado pXvCu associado à resistência ao cobre em *X. vesicatoria*. Esses mesmos autores comprovaram que a transferência desse gene por conjugação poderia transformar isolados sensíveis em tolerantes. Cooksey (1990), seguindo essa mesma linha de estudo relatou que a resistência ao cobre pode ser avaliada por genes encontrados em plasmídeos e/ou cromossomos. Através do estudo, dessas moléculas observaram que em todos os isolados de *X. vesicatoria* avaliados na Califórnia (EUA) estava presente um plasmídeo semelhante ao pXvCu, levando a entender que tais informações genéticas são transmissíveis via transferência conjugativa (AGRIOS, 2005). Mais recentemente Voloudakis et al. (2005) descreveram uma nova ORF em bactérias induzida pela exposição ao cobre, denominada copL. Ao ser analisada, essa sequência mostrou homologia com os genes copAB de *X. axonopodis* pv. *citri*, de *X. campestris* pv. *campestris* e de *Xylella fastidiosa*.

No Brasil, a preocupação com a resistência de bactérias aos cúpricos também ocorre e estudos sobre a eficácia destes produtos vêm sendo realizados com frequência e apontam os mais diversos resultados. Por exemplo, Quezado-Duval (2003), mostrou que isolados de *Xanthomonas* spp. associadas à mancha-bacteriana do tomateiro foram resistentes a baixa concentração de cobre, (50 µg/ml). Já Aguiar et al. (2003), demonstraram o efeito de formulações cúpricas e cuprorgânicas em populações residentes de *X. vesicatoria* do filoplano de pimentão e na redução da severidade da mancha bacteriana observaram que esses produtos foram pouco eficazes para o controle da doença, demonstrando a resistência desses isolados aos produtos aplicados. Em pesquisa semelhante Franco & Takatsu (2004), utilizando isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* verificaram que os níveis de resistência ao cobre alcançaram 300 µg/ml, mas a maior parte destas estirpes resistiram apenas a 100 µg/ml. Bomfeti et al. (2006), testando oxiclreto e hidróxido de cobre sobre *Pantoea ananatis*, associada à mancha-branca do milho, observaram que esta bactéria foi resistente a 750 e 2550 µg/ml, respectivamente, desses ingredientes ativos. Já Meneguim et al. (2007), ao avaliarem a ação do íon Cu^{++} sobre estirpes de *X. axonopodis* pv. *citri* verificaram que estas foram resistentes apenas 50 µg/ml e que o maior percentual destas estirpes era oriundo de áreas com uso contínuo de produtos a base de cobre. Mais recentemente, Nascimento, (2009), testando duas formulações de cúpricos em *X. perforans* e *X. gardneri* observou que somente a concentração 100X (3000 e 3700 µg/ml, respectivamente) as vezes superior a recomendada foi eficiente no controle dessas bacterioses *in vitro*. Frare (2010) constatou que *Acidovorax avenae* subsp. *citriuli* foi resistente a 200 µg/L de hidróxido e oxiclreto de cobre.

No caso específico de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (*Xcvi*), agente etiológico do cancro bacteriano da videira, a eficiência dos cúpricos no manejo da fitomoléstia vem sendo averiguada e iniciou-se com Chand et al. (1991) que avaliaram diversos produtos bactericidas, compostos de cobre e antibióticos para o controle da doença na Índia. Eles concluíram que a aplicação dos mesmos não resultava em redução significativa da incidência do cancro. Anos mais tarde, (CHAND et al., 1994) verificaram que isolados de *Xcvi* já haviam desenvolvido resistência ao cobre, com níveis da ordem de 600 a 1800 µg/ml de Cu^{++} . No Brasil, mais especificamente no Semiárido Malavolta et al. (1999) e Silva et al. (2000), sugeriram além dos antibióticos, o hidróxido e o oxiclreto de cobre como potenciais bactericidas contra *Xcvi*. Lima & Mashima (2000), reportaram que tratamentos químicos de bacelos de videira infectados por *Xcvi* com oxitetraciclina, sulfato de cobre, amônia quaternária ou cloranfenicol não foram eficazes na erradicação do patógeno. Da mesma forma, Araujo et al. (2001; 2004b) detectaram, tolerância ao íon cobre em isolados de *Xcvi* procedentes do Vale do São Francisco, informação essa que corrobora com os resultados de Marques et al. (2009), que observaram que *Xcvi* apresenta variabilidade no nível de tolerância ao cobre, informando que a maior concentração tolerada pela bactéria foi de 350 µg / ml.

Produtos cúpricos são amplamente empregados em diferentes culturas de interesse agrícola e na viticultura não é diferente, pois após a realização das podas, é necessário proteger os ferimentos e evitar a entrada de bactérias como *Xcvi* e de outros patógenos. Mas, além dos cúpricos outros agroquímicos são relatados como possíveis bactericidas, dentre os quais se destaca os ditiocarbamatos que possuem como princípio ativo o mancozeb e segundo Marco & Stall (1983), podem ser eficientes no controle de linhagens de *Xanthomonas* spp. que apresentam resistência ao cobre. Adaskaveg & Hine (1985) vão um pouco mais além e relatam que tanto isolados sensíveis como os resistentes ao cobre são sensíveis a mesma concentração de mancozeb e este poderia ser utilizado de forma alternada. No entanto, a eficiência do mancozeb não é senso comum

entre os pesquisadores, por exemplo, Meneguim et al. (2007), demonstram em seus resultados que o mancozeb apresenta efeito inibitório no crescimento de *X. axonopodis* pv. *citri* inferior àquele promovido por sulfato de Cobre.

Contudo, até o momento, não existem estudos conclusivos com relação ao efeito deste agroquímico ou mesmo do efeito da mistura sulfato de cobre + mancozeb sobre o desenvolvimento de estirpes de *Xcvi*, ainda que tais substâncias sejam empregadas no manejo integrado da videira visando o controle de outras fitomoléstias. Além disso, não existem ainda agroquímicos específicos registrados para o controle químico desta bacteriose (MAPA, 2012), o que gera grandes transtornos aos viticultores Nordestinos que enfrentam no dia a dia perdas ocasionadas *Xcvi*. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar, *in vitro*, os efeitos destas substâncias sobre estirpes de *Xcvi* oriundas da região do Vale do São Francisco e isoladas em diferentes épocas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coletânea de estirpes utilizadas

As estirpes de *Xcvi* oriundas das diversas coletas em pomares do Vale do São Francisco e descritas conforme no Capítulo 1: ENA 4596 (Variedade Red Globe); ENA 4597 (Variedade Itália); ENA 4598 (Variedade Sagraone); ENA 4599 (Variedade Sagraone); ENA 4600 (Variedade Red Globe); ENA 4601 (Variedade Red Globe), ENA 4602 (Variedade Red Globe), ENA 4603 (Variedade Thompson Sendless), ENA 4604 (Variedade Thompson Sendless), foram utilizadas nessa etapa do trabalho. Além dessas, buscou-se junto a Embrapa Semiárido e a bacterioteca do Fitolab/Ufrj outras estirpes, permitisse formar um grupo heterogêneo, de modo a permitir uma investigação da tolerância aos agroquímicos. Dessa forma, na escolha destas estirpes considerou-se o ano de isolamento e local de origem conforme apresentado (Tabela 4).

Tabela 4. Ano e local de coleta dos materiais onde foram isoladas as estirpes de *Xcvi*, avaliadas quanto a resistência.

ESTIRPE	ANO	ORIGEM
ENA 4559	1999	FRUTIMAG - UP01, Parcela 3D – Petrolina/PE
ENA 4560	1999	FRUTIMAG - UP01, Parcela 2 – Petrolina/PE
ENA 4562	1999	FRUTIMAG - UP01, Parcela 1 – Petrolina/PE
XCV004	2008	PISNC - N5 - Petrolina/PE
XCV012	2009	Projeto Curaçá - CAJ- Curaçá/BA
XCV032	2009	Projeto Maria Tereza - Petrolina/PE
XCV046	2009	Projeto Maniçoba- Juazeiro/BA
XCV049	2009	PISNC - N1- Petrolina/PE

XCV050	2009	Bebedouro - Petrolina/PE
XCV054	2009	Casa Nova/BA
XCV063	2009	PISNC N4 - Petrolina/PE
XCV074	2009	PISNC N8 - Petrolina/PE

A distribuição geográfica dos locais onde foram obtidas todas as estirpes usadas neste estudo encontra-se na Figura 20.

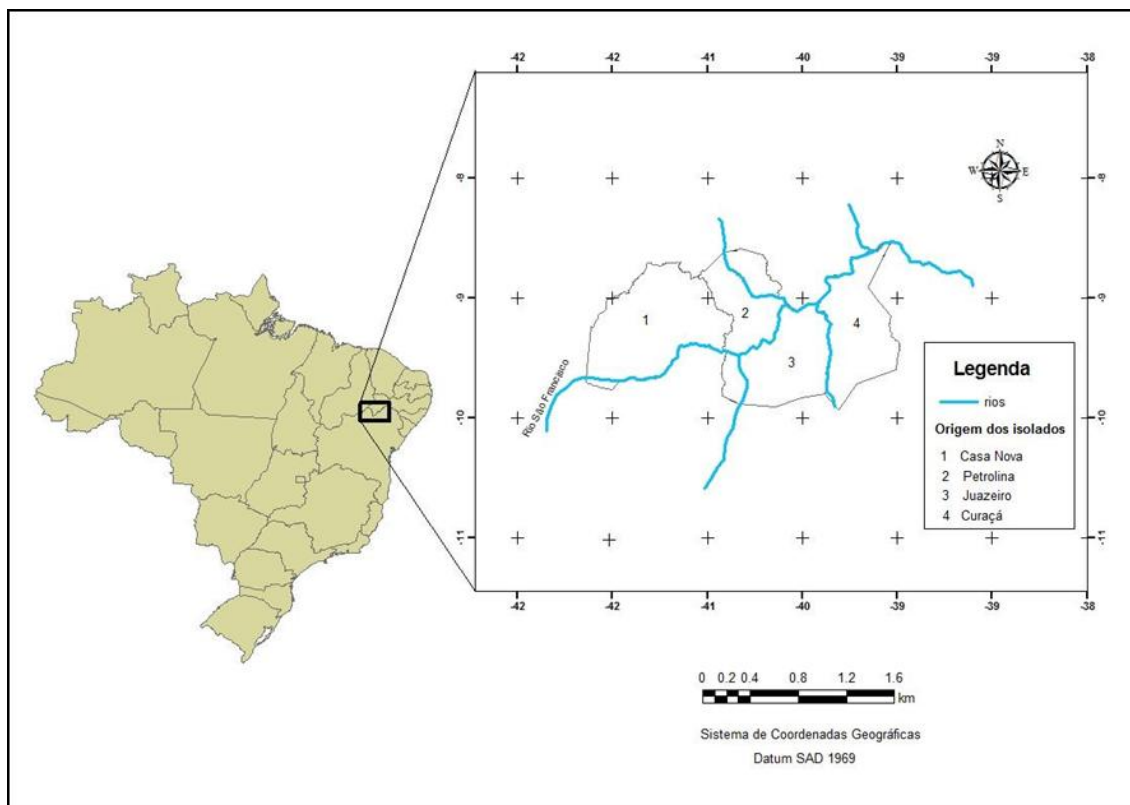


Figura 20. Mesorregião onde ocorreram os primeiros relatos do cancro bacteriano da videira no Brasil e de onde foram isoladas as estirpes de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* investigadas quanto a resistência.

2.2 Teste de Patogenicidade

A patogenicidade das estirpes de *Xcvi* foi averiguada através de ensaios de patogenicidade. Para isso, células bacterianas foram crescidas em meio de cultura Nutriente Agar (NA), por cerca de 24h a 48h, período de tempo correspondente a fase exponencial de crescimento das fitobactérias (ROMEIRO, 1973). Em seguida, solução salina (NaCl a 0,85% em água destilada) foi adicionada a tubos com meio inclinado, até aproximadamente 1/3 da altura dos tubos. As concentrações dos inóculos foram previamente ajustadas para aproximadamente 10^8 ufc/ml, em espectrofotômetro digital, regulado a 560nm e 85% de transmitância. As suspensões dos isolados foram infiltradas com auxílio de seringa hipodérmica, penetrando agulha no mesófilo foliar de mudas de

Vitis vinifera, variedade Red Globe. Após sete dias as folhas inoculadas foram comparadas com os controles, nas quais foi aplicada apenas solução salina.

2.3 Ensaios de resistência *in vitro* aos agroquímicos

Comprovada a patogenicidade das estirpes estudadas iniciaram-se os ensaios de resistência aos agroquímicos, seguindo metodologia descrita por Marco & Stall (1983) (Figura 21). Sendo assim, as diferentes estirpes foram crescidas em meio NA por 48h a 28 °C, suspensos em solução salina de NaCl 0,85% e a concentração das suspensões padronizadas para cerca de 10^8 ufc/ml, utilizando-se espectrofotômetro digital SPECTRO 22RS (Labomed. Inc.) regulado a 560nm de comprimento de onda e 85% de transmitância. A partir dessas soluções, foram coletadas alíquotas de 50 μ l e adicionadas a tubos rosqueados contendo 1,0 ml da solução dos bactericidas sulfato de cobre, mancozeb e da mistura sulfato de cobre + mancozeb, em concentrações crescentes dos princípios ativos (0; 50;100; 150; 200; 250; 300 e 1000 μ g/ml). Ao final do período de uma hora, alíquotas de 0,1 ml de cada tratamento foram retiradas e semeadas em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo meio N.A, sem adição dos bactericidas. A sensibilidade de cada estirpe foi avaliada após 72h de incubação a 28°C, através da contagem do número de colônias crescida nas placas.

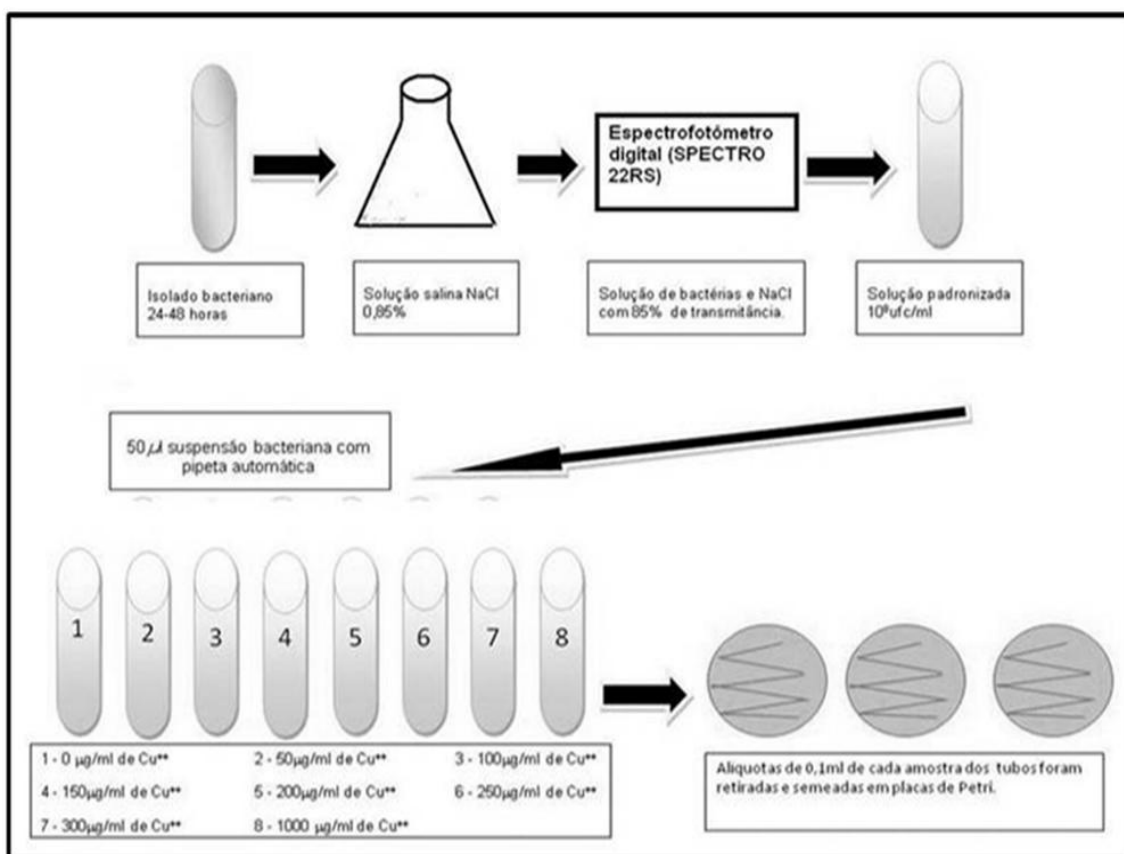


Figura 21. Esquema ilustrativo da metodologia de avaliação da resistência de *Xcvi* aos agroquímicos baseado em Marco & Stall (1983) e Araujo (2001).

Os números de colônias obtidos foram divididos em cinco grupos da seguinte forma: 0 = ausência de crescimento de colônias bacterianas; 1 = 1 a 50 colônias; 2 = 51 a 100 colônias; 3 = 101 a 150 colônias e 4 = acima de 151 colônias (Figura 22).

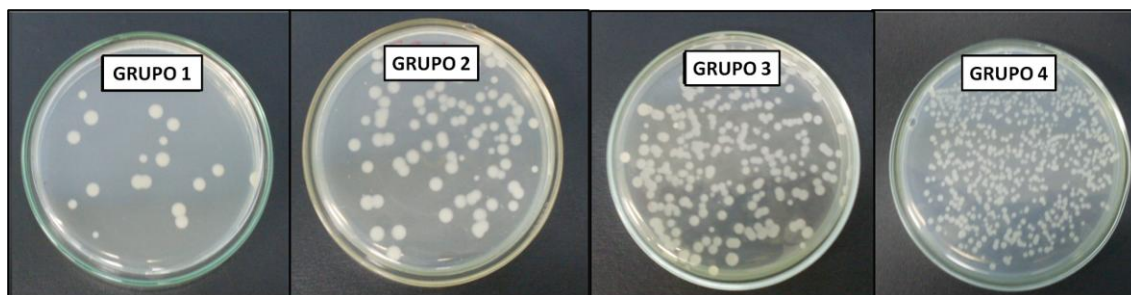


Figura 22. Exemplos de crescimentos obtidos nos ensaios experimentais, demonstrando números de colônias bacterianas desenvolvidas e forma com que foram agrupadas em escala de notas durante avaliação da resistência de *Xcvi* aos agroquímicos estudados.

Os ensaios foram organizados em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x3, contando com três repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri. O experimento foi repetido três vezes e os dados analisados de forma conjunta. Foi realizado o teste de homogeneidade da variância (Bartlett, 1937) citado por Snedecor & Cochran (1983). Empregou-se o teste Fisher-Snedecor (F), para análise das variâncias e Scott & Knott (1974) ou Tukey para teste de médias conforme o número de comparações.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Plantas submetidas aos testes de patogenicidade manifestaram formação de manchas necróticas (Figura 23 B, D e F) no mesófilo foliar próximo à região onde foi realizada a infiltração de inóculo de *Xcvi*. De forma diferente, as que receberam infiltração de solução salina nas folhas não desenvolveram sintomas (Figura 23 A, C e E), comprovando a capacidade do patógeno em ocasionar doença em videiras. Resultado que corrobora com as inoculações realizadas por (Malavolta Jr. et al., 1999; Lima et al., 1999; Araujo et al.; 1999), ao realizarem os primeiros estudos com essa bactéria no Brasil.

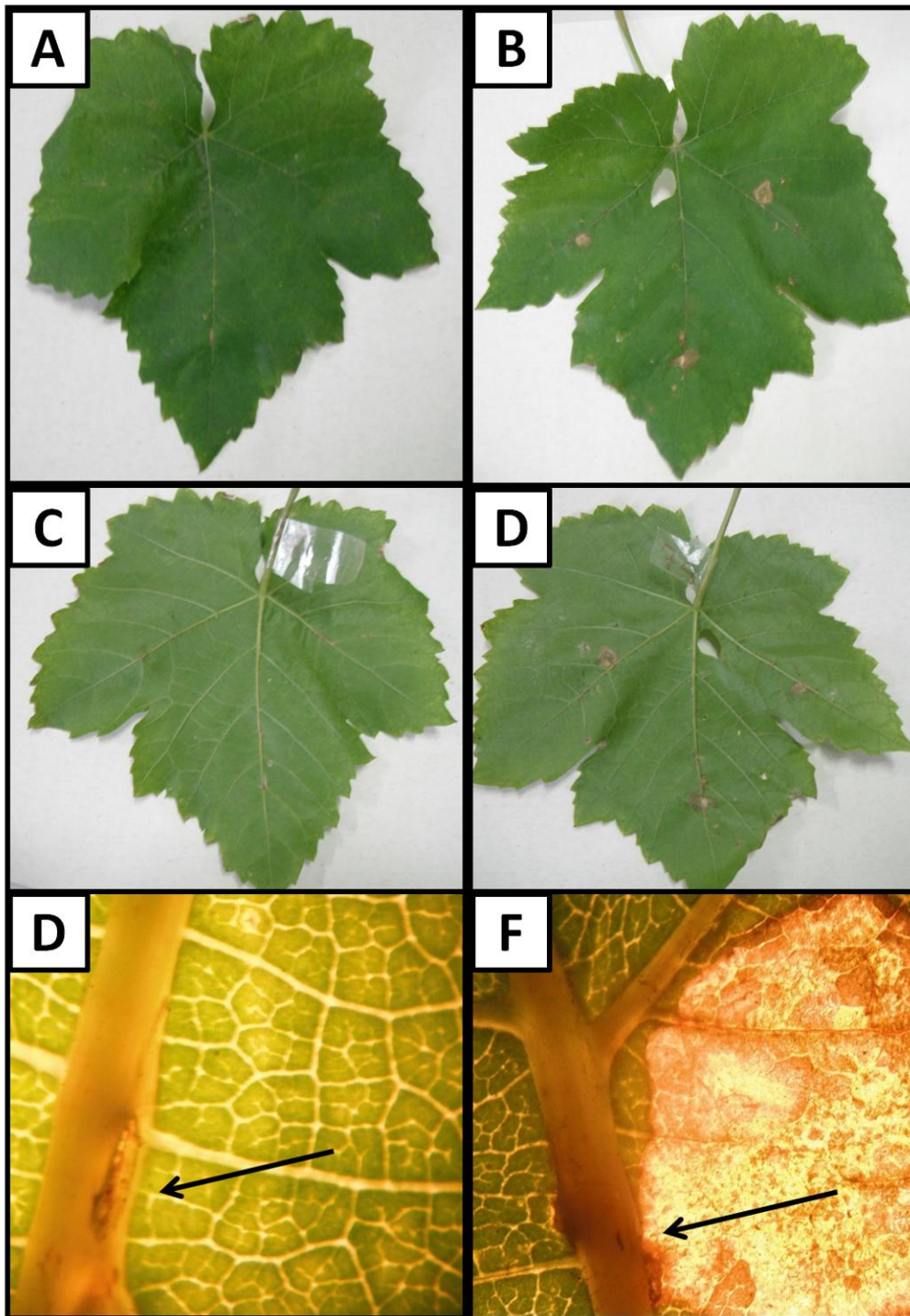


Figura 23. Infiltração de suspensão de 10^8 ufc/ml de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em plantas de videira Red Globe, mantidas em casa de vegetação. Detalhe da Face ventral (A) e Face dorsal (C) de folha de *Vitis vinifera* apresentando mesófilo foliar assintomático, controle negativo. Também notar Face ventral (B) e Face dorsal (D) da folha, manifestando sintomas no mesófilo foliar decorrente da patogenicidade de *Xcvi*. E detalhe do ponto exato da nervura (E) onde foi infiltrada solução salina 0,85% e integridade da região ao redor. De forma contrastante, notar ponto exato da nervura (F) onde foi realizada a infiltração de suspensão de *Xcvi* e necrose da região ao redor.

Com relação às análises de resistência de *Xcvi* aos agroquímicos, observou-se que o agrupamento do número de colônias promoveu a formação de conjunto de dados que apresentaram homogeneidade, segundo o teste de Bartlett (1937) citado por Snedecor & Cochran (1983), sendo então interessante a realização da análise de variância (COSTA NETO, 1977), além de elucidar que substância e concentração poderiam repercutir em maiores expectativas de eficiência em condições comerciais de cultivo nos parreirais do Semiárido.

Aplicando o teste Fisher-Snedecor (teste F) para análise das variâncias, observou-se todas como sendo altamente significativa, sendo, portanto, oportuno a realização de testes de média (Figura 24 e 25) para análise de maneira ampla as diferenças apontadas pelo teste (F). O crescimento médio geral das diferentes estirpes, quando expostas a concentrações crescentes de agroquímicos, foi necessária a análise de regressão (Figura 26), pois são fatores quantitativos e essa análise é a técnica mais apropriada para inferir sobre tais resultados (CHEW, 1976) citado por SANTOS et al. (1998); BEZERRA NETO et al. (2002); BERTOLDO et al. (2008).

Ressalte-se também que todos os fatores foram significativos, indicando que ocorreram interações, sugerindo que, em geral, o crescimento médio das diferentes estirpes foi influenciado por diferenças em bases genéticas, substância testada e concentrações. Dessa forma, procedeu-se uma análise separada com o desdobramento do quadro de Anova, com o intuito de simplificar o entendimento desta pesquisa.

Análise do fatorial contendo todos agroquímicos e as suas diferentes concentrações utilizadas nos ensaios constatou-se através do teste de médias Scott & Knott (1974) que a maior parte das estirpes obtidas entre os anos 2008/2010, exceto ENA 4602, diferiram estatisticamente, quanto ao número de colônias desenvolvidas, daquelas obtidas no ano de 1999, época do surgimento da bacteriose no Brasil, as quais foram mais sensíveis a ação dos bactericidas (Figura 24). Tal resultado permite suspeitar que ao logo da última década ocorreu pressão de seleção sobre populações de *Xcvi*, impulsionando a incorporação de componentes para resistência à produtos a base de cobre aplicados nos parreirais do Vale do São Francisco. Hipótese essa que Marques et al. (2009) ao estudarem esse mesmo patógeno, já haviam sinalizado possível co-evolução da espécie quanto à resistência aos cúpricos. Estes autores sugeriram ainda que as diferenças observadas em relação à sensibilidade ao cobre entre as estirpes de *Xcvi* estudadas podem levar à seleção e dominância das estirpes mais tolerantes. Situação semelhante já fora descrita por Stall et al. (1986) em outro patossistema, mas tratando do mesmo gênero bacteriano.

A variabilidade genética de populações bacterianas vem sendo amplamente estudadas e tendo em vista estudos realizados com espécies bacterianas filogeneticamente próximas de *Xcvi*, é plausível especular que tais resistências podem estar atreladas a genes específicos (Stall et al., 1986; Cooksey, 1990; Behlau et al., 2011).

Os resultados obtidos indicam, entretanto, que os agroquímicos atualmente utilizados continuam surtindo efeito inibitório no desenvolvimento de colônias de *Xcvi* (Figura 24), reforçando o que foi anteriormente apontado por Chand et al. (1992) e Chand et al. (1994) na Índia; e por Silva et al. (2000) e Marques et al. (2009) em pesquisas conduzidas no Brasil. Contudo, vale ressaltar que para tal efetividade é necessário que a célula bacteriana entre em contato com direto com o bactericida. Condição que pode não ocorrer em aplicações de campo (*in situ*). Adicionalmente, considera-se que *Xanthomonas* spp, em geral, realizam também colonização sistêmica do tecido vegetal (RYAN et al., 2011), ficando então protegida da ação desses agroquímicos que agem e exclusivamente por contato.

Todavia, analisando por outra ótica tal situação na qual é relatada a questão da sobrevivência epifítica dessa bacteriose no mesófilo foliar, bem como em plantas assintomáticas, (LIMA & FERREIRA 2000; NASCIMENTO et al., 2000; ARAÚJO 2001; ARAÚJO et al., 2004), a efetividade de tais agroquímicos, tal como observado na Figura 7, ganha importância, pois pode reduzir potencial de inóculo, além de promover proteção de sítios de penetração da bactéria na planta, sobretudo considerando-se imediatamente após as podas, quando são provocados ferimentos que favorecem a epidemia da bacteriose.

Quanto à eficiência das substâncias empregadas (Figura 25), analisado através do teste de Tukey, observa-se que o sulfato de cobre apresentou maior efeito inibitório do crescimento bacteriano em relação ao mancozeb. Além disso, foi possível constatar efeito sinérgico do sulfato de cobre + mancozeb, corroborando com Marco & Stall (1983), que ao testarem soluções de cobre verificaram que íons Cu^{++} , por si só, não eram efetivos para o controle da doença e que para uma maior eficácia, sugeriu a combinação cobre + mancozeb. Em oposição a essa recomendação, Meneguim et al. (2007), defendem que a adição de mancozeb à solução cúprica proporciona o incremento do crescimento de *X. axonopodis* pv. *citri*, pois observaram que células dessa bactéria são erradicadas quando expostas a solução cúprica na concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$, porém quando submetidas à sulfato de cobre + mancozeb, resultavam na formação de colônias resistentes até a concentração de 200 $\mu\text{g/ml}$.

Pela análise de regressão pode-se observar o efeito bactericida, aquilatado *in vitro*, da mistura sulfato de cobre + mancozeb e também para o sulfato de cobre (Figura 25). Ao passo que o emprego de mancozeb apenas teria ação bacteriostática, haja vista que mesmo na maior concentração, de forma geral, não foi capaz de cessar a formação de colônias.

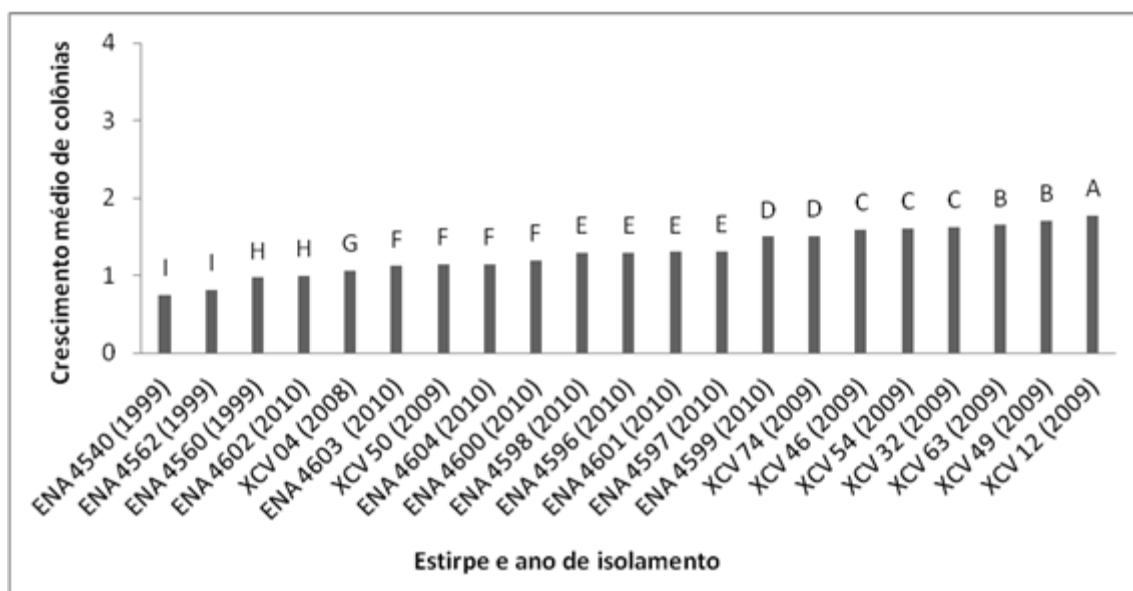


Figura 24. Avaliação *in vitro* do crescimento de diferentes estirpes de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, quando expostas a concentrações de 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 1000 $\mu\text{g/ml}$ dos agroquímicos sulfato de cobre (SC), mancozeb (M) e mistura (SC) + (C), através do teste Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade de erro. Letras iguais traduzem-se em não significância estatística entre as médias.

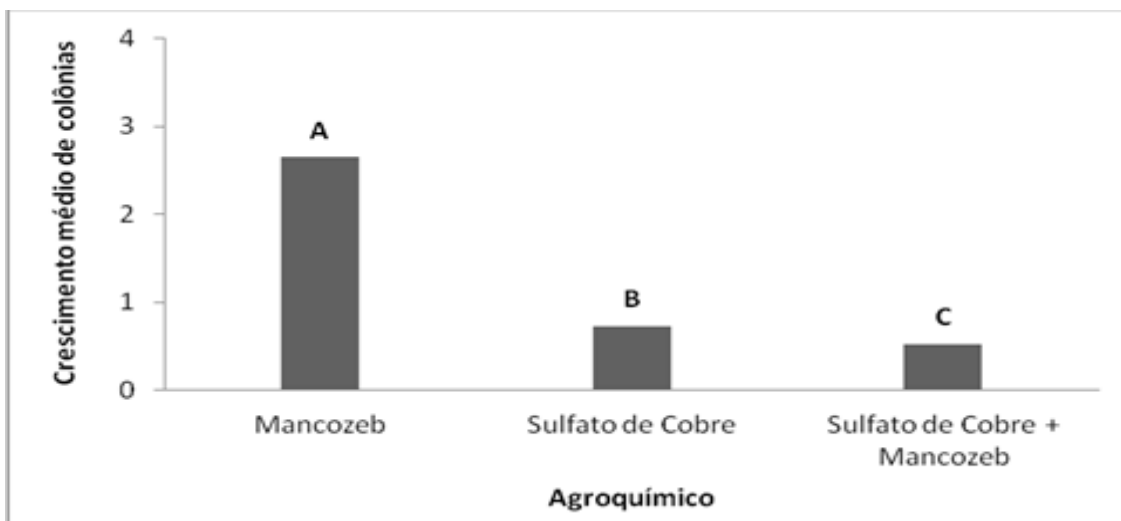


Figura 25. Avaliação *in vitro* do efeito sinérgico da mistura sulfato de cobre + mancozeb na inibição do crescimento de diferentes estirpes de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, através do teste TuKey em nível de 5% de probabilidade de erro. As letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os agroquímicos utilizados nas concentrações 0; 50; 100; 150; 200; 250; 300 e 1000µg/ml.

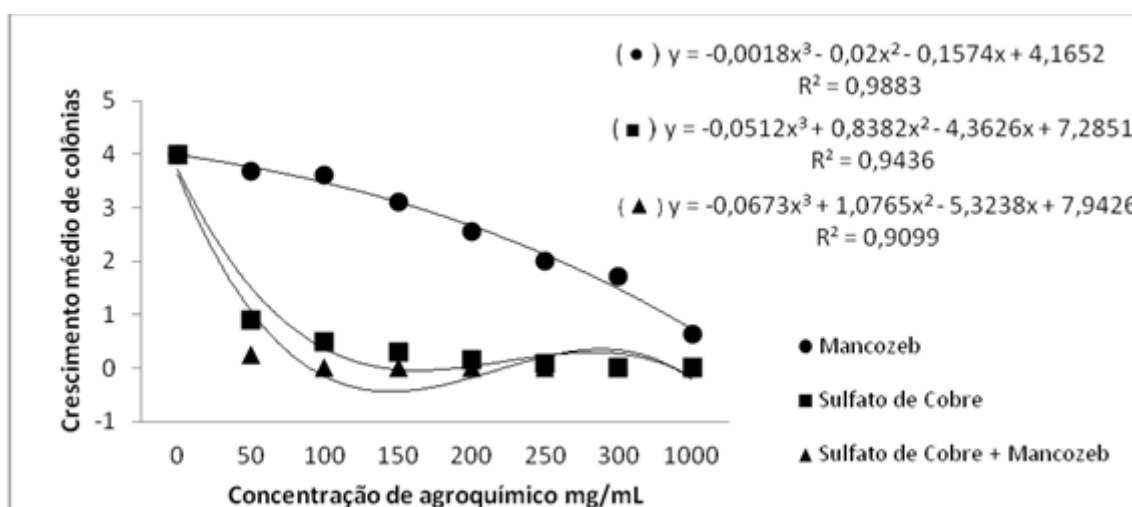


Figura 26. Regressão alcançada para a avaliação *in vitro* de diferentes concentrações de Sulfato de Cobre (SC), Mancozeb (M) e Mistura (SC) + (C) na erradicação ou não de diferentes estirpes de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*.

Após o desdobramento das variáveis, foi possível ter visão mais detalhada dos resultados obtidos com relação ao aspecto da resistência de *Xcvi* frente aos agroquímicos sulfato de cobre, mancozeb e da mistura dos dois, pois identificou-se a variabilidade genética entre as estirpes de *Xcvi* referente a resistência aos agroquímicos (Figuras 27, 28 e 29) bem como o efeito real de cada substância e concentração sobre o crescimento e desenvolvimento do número de colônias (Figuras 30, 31 e 32).

Dessa maneira, através das Figuras 26 e 27 busca-se demonstrar que o sulfato de cobre apresenta efeito na inibição do crescimento de *Xcvi*, mas que concentrações acima

de 250 mg/ml promovem ação erradicante (Figuras 26). Além disso, pode-se observar também na figura 27 diversidade de populações desenvolvidas, o que possivelmente é resultado de expressão da variabilidade genética entre as estirpes. Quando confrontando essas informações com condições de campo observa-se que a concentração de sulfato de cobre Agrimar (RIZZI & CIA. LTDA) e sulfato de cobre Microsal (MICROSAL INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA), ambas recomendadas no manejo de outras fitomoléstias da videira, são cerca de 40 e 25 vezes maior, respectivamente, daquela informada pelos fabricantes como erradicantes (MAPA - AGROFIT, 2012). Tal fato é preocupante, pois descredenciaria o potencial dessas substâncias atuarem como bactericidas. Todavia, ao considerar-se condições de campo, é importante salientar que existem série de fatores que podem influenciar na concentração final da calda até que atinja o alvo, e quando isso ocorre pode ser que já tenha decrescido a concentrações próximas daquelas aqui estudadas.

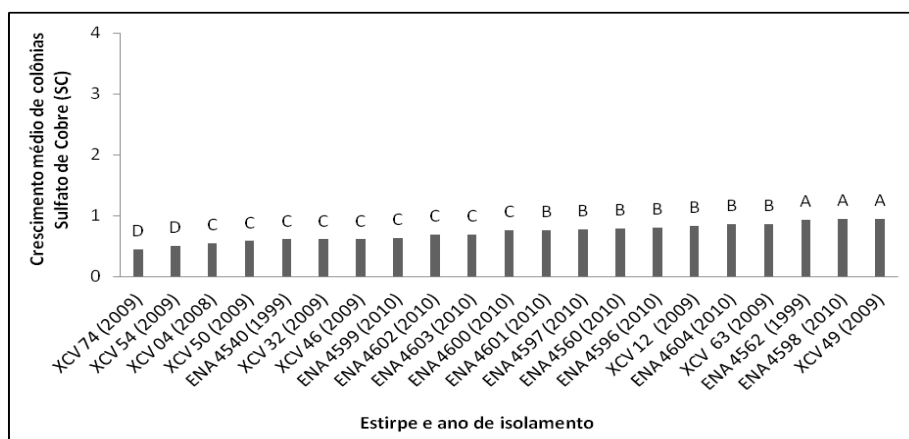


Figura 27. Avaliação *in vitro* da sensibilidade de diferentes estirpes de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* quando exposta ao agroquímico sulfato de cobre através do teste Scott - Knott em nível de 5% de probabilidade de erro. Letras iguais traduzem-se em não significância estatística entre as médias.

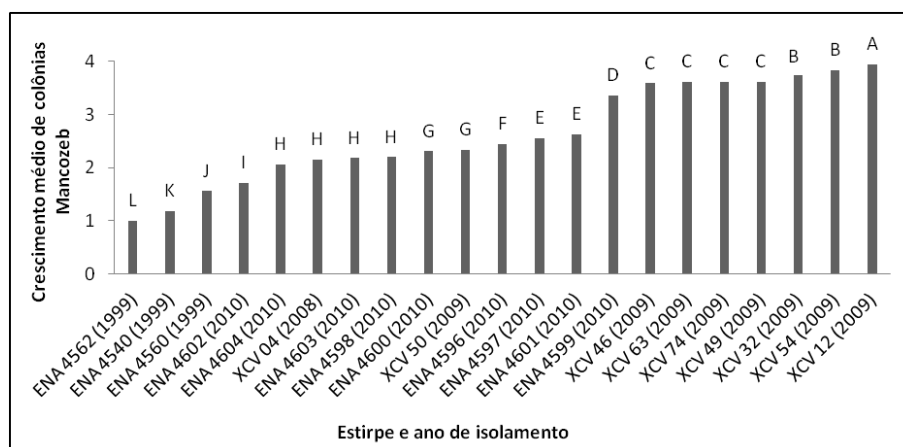


Figura 28. Avaliação da sensibilidade *in vitro* de estirpes de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* após tratamento com mancozeb, através do teste Scott - Knott em nível de 5% de probabilidade de erro. Letras iguais traduzem-se em não significância estatística entre as médias.

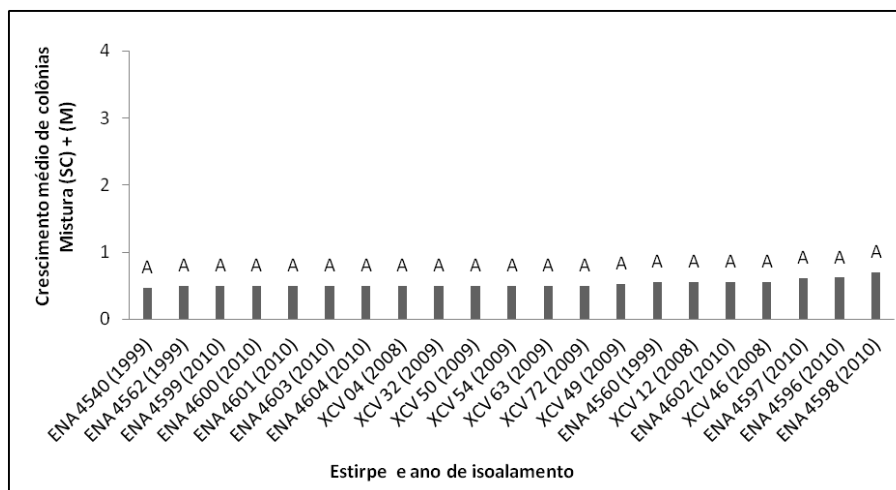


Figura 29. Avaliação da sensibilidade *in vitro* de estirpes de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* após tratamento com sulfato de cobre + mancozeb, através do teste Scott - Knott em nível de 5% de probabilidade de erro. Letras iguais traduzem-se em não significância estatística entre as médias.

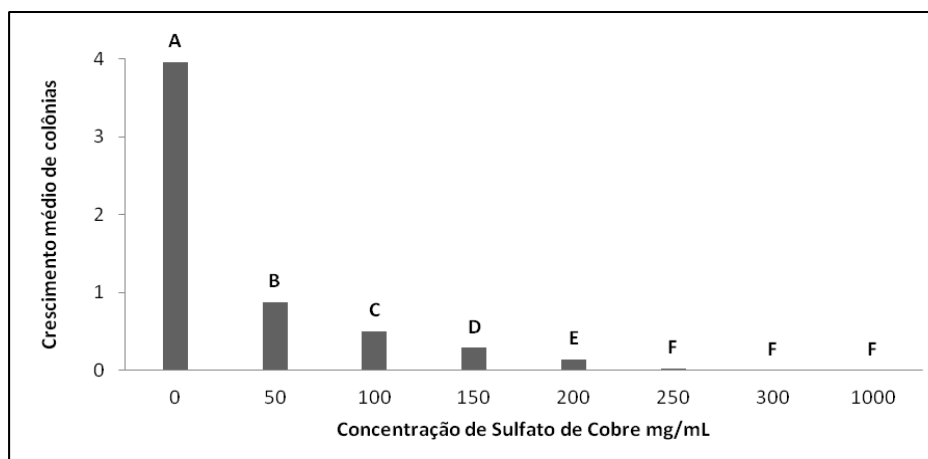


Figura 30. Estudo *in vitro* de concentrações de sulfato de cobre mais eficientes na erradicação de diferentes estirpes de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, através do teste Scott - Knott em nível de 5% de probabilidade de erro.

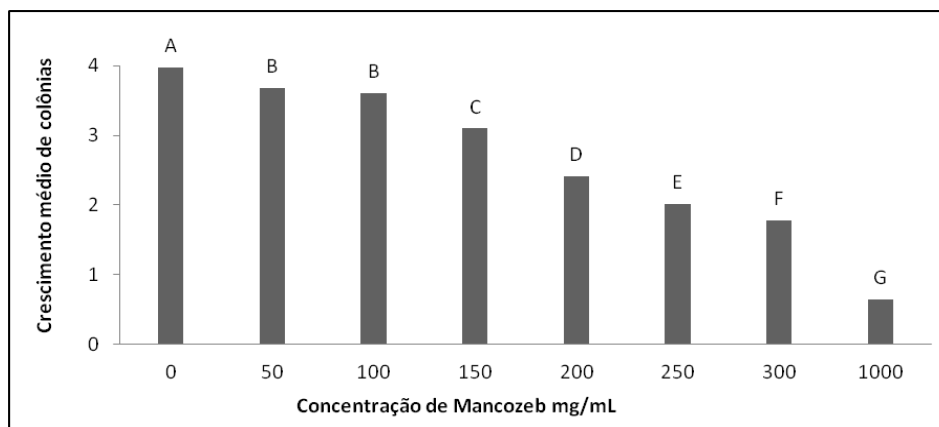


Figura 31. Avaliação da sensibilidade *in vitro* de estirpes de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* após tratamento com mancozeb, através do teste Scott - Knott em nível de 5% de probabilidade de erro. Letras iguais traduzem-se em não significância estatística entre as médias.

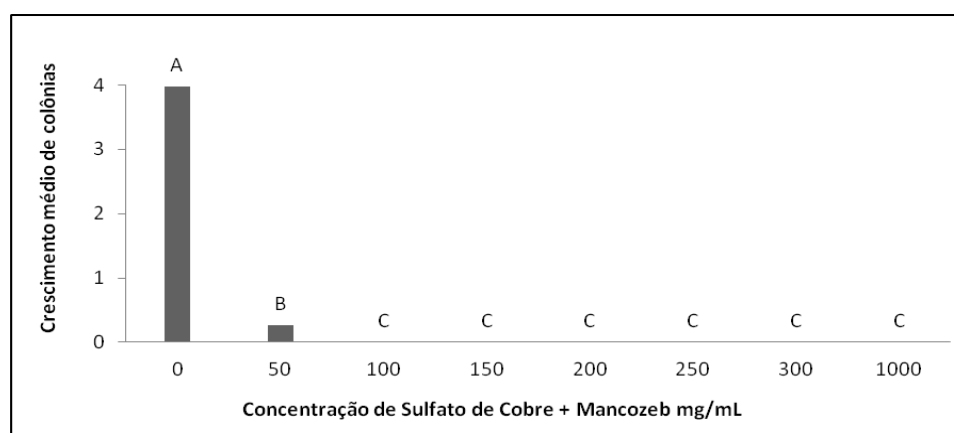


Figura 32. Estudo *in vitro* de concentrações de sulfato de cobre + mancozeb na inibição do crescimento de diferentes estirpes de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, através do teste Scott - Knott em nível de 5% de probabilidade de erro. Letras iguais traduzem-se em não significância estatística entre as médias.

Pressões de seleção ocorrendo rotineiramente pode induzir a diversidades de respostas observadas nas Figura 27 e 28. Fenômeno melhor explicado por Marques et al. (2007) através de análise de genes específicos em *Xcvi* que conferem resistência ao cobre. Também pode ter relação com as diferenças polimórficas descritas por Trindade, et. al. (2005) em estudo molecular desse mesmo patógeno.

Quando utilizando o mancozeb (Figura 28), a expressão de variabilidade genética das estirpes foi mais acentuada em relação aos outros agroquímicos estudados, fato ainda não discorrido pela literatura pesquisada que trata de *Xcvi*. Contudo, deve ser investigado, pois trata-se de fungicida amplamente empregado na viticultura para manejo integrado de diversas doenças (MAPA-AGROFIT, 2012).

Por outro lado, os resultados apresentados nas Figuras 25 e 32, indicam que a mistura sulfato de cobre + mancozeb, apresentam efeito sinérgico, exemplificado na Figura 32, onde concentrações menores que 100 mg/ml foram suficientes para inibir totalmente o desenvolvimento de colônias, fato também relatado em Marco & Stall (1983), que, além disso, cogitam a possibilidade da utilização dessa mistura para o

manejo de populações de *Xanthomonas* spp. resistentes aos cúpricos. Informação que corrobora com nossos resultados apresentados na Figura 25, onde não se observa diferença estatística com relação ao número de colônias formadas após o tratamento com a mistura entre as diferentes estirpes.

Por outro lado, Meneguim et al. (2007), ao estudar estirpes de *X. axonopodis* pv. *citri*, vindas de diferentes áreas de produção de citros discutiram tal questão e concluíram que a mistura sulfato de cobre + mancozeb não teria efeito sinérgico, alegando que o mancozeb complexaria íons Cu^{++} . Provavelmente, chegaram a essa conclusão porque padronizaram o pH da calda usada em pH entre 7,0 e 7,2, diminuído o efeito bactericida da solução. No presente estudo o pH médio das soluções preparadas na concentração de 100 mg/ml da mistura sulfato de cobre + mancozeb, a 28 °C, foi igual a 4,28. Há que se considerar também, que soluções de mancozeb, tendem a neutralidade quando sob 28°C, ao passo que as preparadas com sulfato de cobre resultam em acidez, forma que se comporta misturas destes agroquímicos (Figura 33).

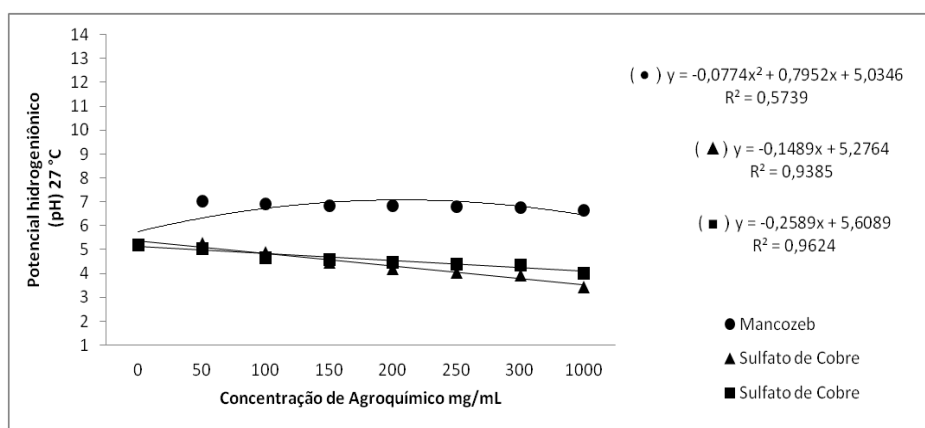


Figura 33. Variação do potencial hidrogeniônico (pH) das caldas de Mancozeb, Sulfato de Cobre e da mistura dos dois agroquímicos em temperatura de 27 °C.

4 CONCLUSÕES

1. Foram identificadas estirpes de *Xcvi* expressando resistência *in vitro* a concentrações de até 50 mg/ml de sulfato de cobre + mancozeb, 250 mg/ml de sulfato de cobre e 1000 mg/ml de mancozeb;
2. Transcorridos cerca de quatorze anos desde o surgimento de *Xcvi* da região do vale do São Francisco, observa-se co-evolução de estirpes da espécie quanto à resistência *in vitro* aos principais bactericidas empregados no manejo do cancro bacteriano da videira. Fato que serve de alerta para o desenvolvimento de estratégias para minimizar o progresso dessa evolução.
3. A mistura sulfato de cobre + mancozeb resultou em melhor desempenho no controle *in vitro* do crescimento de populações de *Xcvi*. Fato que sustenta continuação do emprego criterioso dessa mistura na viticultura nordestina, e dentro de um programa de manejo integrado do cancro da videira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ADASKAVEG, J. E.; HINE, R. B. Copper Tolerance and Zinc Sensitive of Mexican Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, Causal agent of bacterial spot of pepper. **Plant Disease**, v. 69. n. 11, p 993 - 996, 1985.

AGRIOS, G. N. (Ed.). **Plant pathology**. 5. ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. 922 p.

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

AGUIAR, L. A.; KIMURA, O.; CASTILHO, A. M.; CASTILHO, K. S. C.; RIBEIRO, R. L. D.; AKIBA, F.; CARMO, M. G. F. Resistência ao cobre em isolados nacionais de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* de pimentão e tomateiro. **Agronomia** v. 34, p. 78-82, 2000.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ARAÚJO, J. S. P.; BUENO, J. R. F.; CRUZ, G. B.; OLIVEIRA, B. C.; ROBBS, C. F.; RIBEIRO, R. L. D.; POLIDORO, J. C. Produção e caracterização de anticorpos policlonais contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 305-309, 2005.

ARAÚJO, J. S. P.; ROBBS, C. F.; RIBEIRO, R. L. D. Manejo Integrado de Fitobacterioses de Importância Econômica no Brasil. Parte 2. **Revisão anual de patologia de plantas**, Passo Fundo-RS, v. 12, p. 147 - 200, 2004.

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

ARAÚJO, J. S. P. **Perfil Epidemiológico e Subsídios para o Controle de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, Agente do Cancro Bacteriano da Videira (*Vitis vinifera* L.) no Brasil.** 2001.125 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2001.

ARAÚJO, J. S. P.; ROBBS, C. F.; MACIEL, G. F. Novos hospedeiros alternativos de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 25, n. 1, p. 83, 1999.

BASHAN, Y.; ASSOULINE, I. Complementary bacterial enrichment techniques for the detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in infested tomato and pepper seeds. **Phytoparasitica**, v. 11, p. 187-193, 1983.

- BEHLAU, F.; CANTEROS, B. I.; MINSAVAGE, G. V.; JONES, J. B.; GRAHAM, J. H.. Molecular Characterization of Copper Resistance Genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas* alfalfa subsp. *Citrumelonis*. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 77, n. 12, p. 4089–4096, 2011.
- BERIAM, L. O. S.; ROBBS, C. F.; RODRIGUES NETO, J. Galha bacteriana (*Agrobacterium* sp.) em videira no Estado do Rio Grande do Norte. **In: Reunião anual do Instituto Biológico**, 4, 1991, São Paulo. Resumos São Paulo: IB, 1991. p. 04.
- BERTOLDO, J. G.; ROCHA, F.; COIMBRA, J. L. M.; ZITTERELL, D.; GRAH, V. F. Teste de comparação de médias: dificuldades e acertos em artigos científicos. **R. Bras. Agrobiência**, Pelotas, v. 13, n. 4, p. 441-447, 2007.
- BEZERRA NETO, F.; NUNES, G. H. S.; NEGREIROS, M. Z. Avaliação de procedimentos de comparações múltiplas em trabalhos publicados na revista Horticultura Brasileira de 1983 a 2000. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 1, p. 05-09, 2002.
- BOMFETI, C. A.; MEIRELLES, W. F.; SOUZA-PACCOLA, E. A.; CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; MARRIEL, I. E.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Avaliação de produtos químicos comerciais, *in vitro* e *in vivo* no controle da doença foliar, mancha branca do milho, causada por *Pantoea ananatis*. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 1, p. 63-67, 2007.
- BULL, C. T.; BOER, S. H.; DENNY, T. P.; FIRRAO, G.; FISCHER-LE SAUX, M.; SADDLER, G. S.; SCORTICHINI, M.; STEAD, D. E. and TAKIKAWA, Y.. Letter to the editor comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980-2007. **Journal of Plant Pathology**, v. 92, n. 3, p.551-592, 2010.
- CHA, J. S.; COOKSEY, D. A. Copper Resistance. *Pseudomonas Syringae* Mediated by Periplasmic and Outer Membrane Proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 88, p. 8915–8919, 1991.
- CHAND, R.; SINGH, D.; SINGH, R. Copper and streptomycin resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Journal of Plant diseases and Protection Stuttgart.**, v. 101, n. 5, p. 487-491, 1994.
- CHAND, R. Source of resistance to grapevine bacterial canker disease in *Vitis*. **Indian Institute of Horticultural Research**, Bangalore, v. 31, p. 83-86, 1992.
- CHAND, R.; PATIL, B. P.; KISHUM, R. Management of bacterial canker disease (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*) of grape vine (*Vitis vinifera*) by pruning. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 61, p. 220-222, 1991.
- CHEW, V. Comparing treatment means: a compendium. **Hortscience**, Alexandria, v.11, n. 4, p. 348-35, 1976.
- COOKSEY, D. A. Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, n. 1, p. 201-219, 1990.

CORRÊA, L. S.; BOLIANI, A. C. **O cultivo de uvas de mesa no Brasil e no mundo e sua importância econômica.** In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE UVAS DE MESA, Ilha Solteira. Culturas de uva de mesa do plantio a comercialização: *Anais*. Ilha Solteira, 2001.

COSTA NETO, P. L. O. **Estatística.** São Paulo: Edgard Blücher, 1977. 264p.

DYE, D. W. Genus *Xanthomonas* DOWSON 1939. In YOUNG, J. M.; BRADBURY, J. F.; PANAGOPOULOS, C. G.; ROBBS, C. F. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. N. Z. J. **Agricultural Research**, n. 21, p. 153-177, 1978.

FONSECA, M. C. C.; ZAGO, V. C. P; FERREIRA, E. P. B.; CÂMARA, A. F. S; RUMJANEK, N. G. Isolamento e caracterização morfológica de *Pseudomonas* ssp. Fluorescentes nativas em sistemas de produção agrícola. **Comunicado Técnico Embrapa**, n. 43, p. 1-4, 2000.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. Statistics Division 2012| Disponível em: < <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em 15 de Janeiro de 2012.

FRANCO, M. M.; TAKATSU, A.. Sensibilidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* ao cobre. Uberlândia, **Bioscience Journal**, v. 20, n 2, p. 207-210, 2004.

FRANKEN, A. A. L. M. Application of polyclonal and monoclonal antibodies for the detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in crucifer seeds using immunofluorescence microscopy. **Netherlands Journal Plant Pathology**, Wageningen, v. 98, n. 2, p. 95-106, 1992.

FRARE, V. C. **Tratamento de sementes de melão (*Cucumis melo* L.) para controle de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*.** 82 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Departamento de Fitopatologia, Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz-ESALQ, Piracicaba, 2010.

FREIRE, F. C. O.; OLIVEIRA, A. D. S.: **Ocorrência do Cancro-bacteriano da Videira no Estado do Ceará.** Comunicado Técnico Embrapa, Fortaleza, n. 62, 2001. 2p.

GAMA, M. A. S., MARIANO, R. L. R., VIANA, F. M. P., FERREIRA, M. A. S. V., SOUZA, E. B.; Poliphasic Characterization of Pigmented Strains of *Xanthomonas* Pathogenic to Cashew Trees. **Plant Disease**, v. 95, n. 7, July 2011.

HALFELD - VIEIRA, B. A.; NECHET, K. L. Bacterial Canker of Grapevine in Roraima, Brazil. **Fitopatologia brasileira**, v.31, n.6, pp. 604-604. 2006.

HIDALGO, L. **Tratado de Viticultura General.** 2.ed. Ver. Ampl. Madrid: Mundi-Prensa., 1993. 983p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em:

<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp?t=4&z=t&o=26&u1=27&u2=27&u3=1&u4=4>>. Acesso em 20 Janeiro de 2012.

JAMES, E. K.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Experimental Botany**, v. 45, p. 757-766, 1994.

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, 323 p.

KISHINO, A. Y. Características da Planta: Classificação Botânica. In: KISHINO, A. S.; CARVALHO, S. L. C.; ROBERTO, S. R. (Ed.). **Viticultura Tropical: O sistema de produção do Paraná**. Londrina: IAPAR, 2007. p. 87-140.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA 3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**. v. 5, p. 150-163, 2004.

LACERDA, B. S. L.; OLIVEIRA, J. L.; ROMEIRO, R. S.; BROMMONSHENKEL, S. H. Ocorrência de galha em videira incitada por *Agrobacterium*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 16, n. 2, p. 47, 1991.

LEÃO, P. C. S.; BRANDÃO, E. O.; GONÇALVES, N. P. S. Agronomic and molecular traits of the 'Italia Muscat' clone in Sao Francisco River Valley. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 297-302, 2011.

LEÃO, P. C. S.; BORGES, R. M. E. **Melhoramento genético da videira**, Petrolina: Embrapa Semiárido, Série Documentos 224, 2009. 61 p.

LEÃO, P. C. S.; POSSÍDIO, E. L. Histórico da videira. In: SOUZA LEÃO, P. C.; SOARES, J. M. (Ed.). **A viticultura no Semiárido brasileiro** Petrolina: EMBRAPA CPATSA, 2000. p. 13-17.

LEBEN, C. How plant-pathogenic bacteria survive. **Plant Disease**, v. 65, p. 633-637, 1981.

LEVINE, M. An introduction to laboratory technique in bacteriology. **New York: Mac Millan**, 1954. p.68-79.

LIMA, M. F. **Cancro bacteriano da videira causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*: Epidemiologia e Manejo**. Petrolina: Embrapa Semiárido. Circular Técnica da Embrapa Semiárido, n.54, 2000, 22p.

LIMA, M. F.; FERREIRA, M. A. S. V. Infecção latente em porta-enxerto de videira causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* no Submédio do Vale do São Francisco em 1999. **Summa Phytopathologica**, v. 26, p. 127, 2000.

LIMA, M. F.; MASHIMA, C. Tratamento térmico e térmico de bacelos de videira infectados com *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, Suplemento, p. 324, 2000.

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

LIMA, M. F.; FERREIRA, M. A. S. V.; MOREIRA, W. A.; DIANESE, J. C. Bacterial canker of grapevine in Brazil caused by *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 440-443, 1999.

LIMA, M. F.; TAVARES, S. C. C. H.; NASCIMENTO, A. R. P.; MOREIRA, W. A.; MARIANO, R. L. R.; FERREIRA, M. A. S. V. Ocorrência de bacteriose em videira (*Vitis* spp.) no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, Suplemento, p. 210, 1998.

LOPES, D. B.; NASCIMENTO, A. R. P. Situação Atual do Cancro Bacteriano da Videira no Semiárido Nordeste. In: SEMINÁRIO NOVAS PERSPECTIVAS PARA O CULTIVO DA UVA SEM SEMENTES, 2004., **Documentos** 185, Petrolina: Embrapa Semiárido, 2004.p. 68 -76.

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

MALAVOLTA JUNIOR, V. A.; ALMEIDA, I. M. G.; SUGIMORI, M. H.; RIBEIRO, I. A.; RODRIGUES NETO, J.; PIRES, E. J. P.; NOGUEIRA, E. M. C. Ocorrência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videira no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, Suplemento, p. 211, 1998.

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

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

MARQUES, E. **Variabilidade e tolerância ao cobre em *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, agente causal do cancro bacteriano da videira (*Vitis* spp.)**.129 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

MARQUES, A. S. A; GUIMARAES, P. M; SANTOS, J. P; VIEIRA, T. M. Sobrevivência e viabilidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão armazenadas sob condições controladas. **Fitopatologia Brasileira**, 30 (5): 527-531, 2005.

MENEGUIM, L.; RINALDI, D. A. M. F.; SANTOS, A. C. A.; RODRIGUES, L. S.; SILVA, M. R. L.; CANTERI, M. G.; LEITE JÚNIOR, R. P. Sensibilidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ao cobre e mancozeb. **Fitopatologia Brasileira** v. 32, p. 247-252, 2007.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA) **Estatísticas de Comercio Exterior do Agronegócio Brasileiro (AGROSTAT)**. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/pages/AGROSTAT.html>>. Acesso em: 01 março de 2011.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). In: **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFT)** Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso em 15 Janeiro de 2012.

MOURA, R. M. Relembrando Anton de Bary e sua obra fitopatológica. **Fitopatologia brasileira.**, v. 27, n. 4, p. 337-343, 2002.

NASCIMENTO, A. R.. **Ação de Produtos Químicos *in vitro*, em mudas e em campo sobre a mancha bacteriana (*Xanthomonas perforans* e *X. gardneri*) em tomate para processamento industrial**. 126 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Produção Vegetal – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

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

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

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

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI) Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=taxonomy>. Acesso em: 20 de janeiro de 2012.

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

OLIVEIRA, J. R.; ROMEIRO, R. S.; LACERDA, B. S. L. Occurrence of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 on grapevine in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v. 140, n. 6, p. 363-366, 1994.

PARKINSON, N.; COWIE, C.; HEENEY, J.; STEAD, D. Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 264 – 274, 2009.

PEDRO JÚNIOR, M. J.; SENTELHAS, P. C. Clima e Produção. In: POMMER, C.V. (Ed.). **Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003. p. 63-107.

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, 2007.

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, 2006

POMMER, C. V.; MAIA, M. L. Introdução. In: POMMER, C. V. (Ed.). **Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes Editora, 2003. p. 11-35.

QUEIROZ-VOLTAN, R. B; PIRES, E. J. P. A videira. In: POMMER, C. V. (Ed.). **Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003. p. 37-61.

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

RAMOS, G. B. A.; ROSATO, Y. B. Copper accumulation in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Brazilian Journal of Genetics**., v. 19, n. 4, p. 551-554, 1996.

REIS, V. M.; CRUZ, G. B.; FERREIRA, A.; FERNANDES, M. F.; FERREIRA, A. C.; REIS, F. B.; RIBEIRO, J. R. A.; SALLES, J. F.; WEBER, O. B. **Produção e caracterização de soros policlonais para a detecção de bactérias diazotróficas**. EMBRAPA-CNPAB, 1997. 11 p.

ROBBS, C. F.; RODRIGUES NETO, J. Taxonomia de *Xanthomonas*. **Revisão Anual de Patologias de Plantas**, v. 1, p. 143-163, 1993.

ROBBS, C. F.; RIBEIRO, R. D. L. D.; KIMURA, O. Sobre a posição taxonômica de *Pseudomonas mangiferaeindicae* Patel et al. 1948, agente causal da “mancha bacteriana” das folhas da mangueira (*Mangifera indica* L.). **Arquivos Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v. 4, p. 11-14, 1974.

RODRIGUES NETO, J. DESTÉFANO,S.A.L.;RODRIGUES,M.R.L.:PELLOSO,D.S. and LIVEIRA JÚNIOR,L.C.. Grapevine bacterial canker in the State of São Paulo, Brazil: detection and eradication. **Tropical Plant Pathology**., v. 36, n. 1, p. 42-44, 2011.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR., V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. **Summa Phytopathologia**, v. 12, p. 16, 1986.

- ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: UFV, 2001. 279p.
- ROMEIRO, R. S. Reação de hipersensibilidade induzida por bactérias fitopatogênicas. **Revista Seiva**, Viçosa-MG, v. 33, p.13-40, 1973.
- RYAN, R. P.; VORHÖLTER, F.; POTNIS, N.; JONES, J. B.; SLUYS, M. A, V. BOGDANOVE, A. J.; DOW, J. M. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p344-p355, 2011.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology Evolucionary**, v. 4, p. 406-425, 1987.
- SANTOS, J. W.; MOREIRA, J. A. N.; BELTRÃO, N. E. M. Avaliação do emprego dos testes de comparação de médias na revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB) de 1980 a 1994. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 3, p. 225-230, 1998.
- SCHAAD, N. W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. Saint Paul: APS Press, 1988. 158p.
- SCHNEIDER, H. **Métodos de Análise Filogenética**. 2 Ed. Ribeirão Preto: Holos, Editora e Sociedade Brasileira de Genética, 2007. 123p.
- SCOTT, A.; KNOTT, M. Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. **Biometrics**, Washington D.C., v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.
- SILVA, P. C. G; CORREIA, R. C. Caracterização social e econômica da videira. In: SOUZA LEÃO, P. C.; SOARES, J. M. (Eds.). **A viticultura no Semiárido brasileiro Petrolina**. EMBRAPA, 2000. p.19-44.
- SILVA, V. A. V.; AGUIAR, I. F.; CASTRO, G. S. S.; NASCIMENTO, A. R. P.; PAS, C. D. Ação *in vitro* de produtos químicos em relação a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, Suplemento, p. 331, 2000.
- SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Métodos estatísticos**, oitava edição, da universidade de estado de Iowa. Cidade: editora, 1989. 503p.
- STALL, R. E.; LOSCHKE, D. C.; JONES, J. B. Linkage of copper resistance and avirulence. **Phytopathology**, v. 73, p. 241-243, 1986.
- SUMMERS, A. O.; SILVER, S. Microbial transformations of metais. **Annual Review Microbiology**, v. 32, p. 637-672, 1978.
- TAKITA, M. A.; SOUZA, A. A.; BORGES, K. M.; COLETTA FILHO, H. D.; MONGE, G. A.; DESTÉFANO, S.; RODRIGUES NETO, J.; MACHADO, M. A. Região RPF (Regulação de Fatores de Patogenicidade) distingue espécies de *Xanthomonas*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 253. 2004.
- TAVARES, S. C. C. H. **Principais doenças das culturas de: manga, uva, acerola e banana**. Apostila do Curso de Atualização Técnica para Engenheiros Agrônomos do Banco do Brasil. Petrolina: EMBRAPA-CPATSA, 1995.
- TAVARES, S. C. C. H; MENEZES, M. Processo de infecção de *Botryodiplodia theobromae* em plantas de mangueira e videira no Trópico Semiárido brasileiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 16, n. 2, p. 55, 1991.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL-w:improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 4673- 4680, 1994.

TOMAZ, R.; SCREMIN, R. M.; FERREIRA, M. A. S. V.; BARBOSA, M. A. G. Detecção e erradicação de videiras com sintomas do cancro bacteriano no Estado do Paraná. **Tropical Plant Pathology**, 2011. Vol. 36 Suplemento Pagina: 131.

TRINDADE, L. C.; MARQUES, E.; LOPES, D. B. and FERREIRA, M. A. S. V. Development of a molecular method for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Summa Phytopathol.**, v. 33, n. 1, p. 16-23, 2007

TRINDADE, L. C.; LIMA, M. F.; FERREIRA, M. A. S. V. Molecular characterization of Brazilian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* by rep-PCR fingerprinting. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 46-54, 2005.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial **Systematics**. **Microbiological Reviews**, v. 60, p. 407–438, 1996.

VANDERBOSH, K. A. Light and electron microscopic visualization of uricase by immunogold labelling of sections of resin-embedded soybean. **Journal of Microscopy**, v. 143, p. 187-197, 1986.

VAUTERIN, L.; HOSTE B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, n.3, p.472-489, 1995.

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

ANEXOS

ENA 4560 - UFRRJ / JQ513811 - NCBI

CCCTGAGTTTGATCCTGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACG
GCAGCACAGTAAGAGCTTGCTCTTATGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAA
TCTACTCTTTTCGTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATAACGACCTACGGGTG
AAAGCGGAGGACCTTCGGGCTTCGCGCGGTGTAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGCGG
GGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAC
TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCC
TGATCCAGCCATGCCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAG
AAAAGCAGTCGGTTAATACCCGATTGTTCTGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTC
GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGT
GCGTAGGTGGTGGTTTAAAGTCTGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAATTGCAGTGGATA
CTGGGTCACTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCCTGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGA
TCGGGAGGAACATCCGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGACCAACACTGACACTGAGGCACGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTT
GGGTGCCAATTTGGCACGCAGTATCGAAGCTAACCGGTTAAGTTCGCCGCCTGGGGAGTACGGT
CGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAAAT
TCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAACCTTCCAGAGATGGATTGG
TGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGG
GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGCCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACCTCTA
AGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACG
ACCAGGGCTACACACGTACTACAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAAACCCGCGAGGGCAAGCCA
ATCCCAGAAAACCCTATCTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCG
CTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT
CACACCATGGGAGTTTGTGTCACCAGAAGCAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTGCCACG
GTGTGGCCGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGGGGTGGAAAT

XCV 50 - UFRRJ / JQ513812 - NCBI

TGATCCTGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACAG
TAAGAGCTTGCTCTTATGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTCTT
TCGTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATAACGACCTACGGGTGAAAGCGGAG
GACCTTCGGGCTTCGCGCGGTGTAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGC
CCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACG
GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGC
CATGCCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGCTTGTAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAAAGCAG
TCGGTTAATACCCGATTGTTCTGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGT
GGTGGTTTAAAGTCTGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAATTGCAGTGGATACTGGGTCA
CTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCCTGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGG
AACATCCGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGACCAACACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAG
CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAA
TTTGGCACGCAGTATCGAAGCTAACCGGTTAAGTTCGCCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGAACT
GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAAATTCGATGCAA
CGCGAAGAACCCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGG
GAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCC
CGCAACGAGCGCAACCCTTGCCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACCTAAGGAGACCG
CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCT

ACACACGTACTACAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAAACCCGCGAGGGCAAGCCAATCCCAGAA
ACCCTATCTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGTAGTAATC
GCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCCGCCGTCACACCATG
GGAGTTTGTTCACCAGAAGCAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTGCCACGGTGTGGGCC
GATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACTTCCTTA
AA

ENA 4598 - UFRRJ / JQ513813 - NCBI

TTTGAGTTTGATCCTGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCAC
AGTAAGAGCTTGCTCTTATGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTCTTTCGT
GGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATAACGACTACGGGTGAAAGCGGAGGACCTTCGGG
CTTCGCGCGGTTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGAT
CCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCG
GGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAAAGCAGTCGGTTAATACCCGATTGTTCTGACGGTACCCAAA
GAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTACTCGGAATTA
CTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGTGGTGGTTAAGTCTGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAATTG
CAGTGGATACTGGGTCCTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCGCGGTGTAGCAGTGAATGCGTAG
AGATCGGGAGGAACATCCGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGACCAACACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTG
GGGAGCAAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAAGTGGATGTTGGGTGCAAT
TTGGCACCGAGTATCGAAGCTAACCGCTTAAGTTCGCCGCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTC
AAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTT
ACCTGGTCTTGACATCCACGGAACCTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCT
GCATGGCTGTCTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTT
AGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCTAAGGAGACCGCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA
CGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTACTACAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAA
ACCCGCGAGGGCAAGCCAATCCAGAAACCTATCTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATG
AAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACC
GCCCCTCACACCATGGGAGTTTGTTCACCAGAAGCAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTGCCACG
GTGTGGCCGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGT

ENA 4604 - UFRRJ / JQ513814 - NCBI

CCGCACCTTCCGATACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCAGTCATCGGCCACACCGTGGCAA
GCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTGCTTCTGGTGCAACAACTCCCATGGTGTGACGGGCGG
TGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTACTAGCGATTCCG
ACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTGAGATAGGGTTTCTGGGATTGGCTTGC
CCTCGCGGGTTTGCAGCCCTCTGTCCCTACCATTGTAGTACGTGTGTAGCCCTGGTCTGTAAGGG
CCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCGGTCTCCTTAGAGTTC
CCACCATTACGTGCTGGCAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATC
TCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACGGTTCCCGAAGGCACCAATCCA
TCTCTGGAAGTTCCGTGGATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACC
ACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTCAGTCTTGCGACCGTACT
CCCAGGCGGCGAACTTAACGCGTTAGCTTCGATACTGCGTGCCAAATGACACCAACATCCAG
TTCGCATCGTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTNGGCTCCCCACGCTTTCGTG
CCTCAGTGTGAGTGTGGTCCAGGTAGCCGCTTCGCCACGGATGTTCTCCCGATCTCTACGC
ATTTCACTGCTACACCGGGAATCCGCTACCCTTACCACACTCTAGTGACCCAGTATCCACTG
CAATTCACAGGTTGAGCCAGGTCTTTTACAACAGACTTAAACCACCACCTACGCACGCTTTAC
GCCAGTAATTCGAGTAACGCTTGCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGC
CGGTGCTTATCTTTGGGTACCGTCAGAACAATCGGGTATTAACCGACTGCTTTTCTTTCCCAA
CAAAGGGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTACCACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTGCGC

CCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTG
TGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTACGGATCGTCGCCTTGGTGGGCCTTTACCCCGCCA
AGCTAATCCGACATCGGCTCATTCAACCGCGCGAAGCCCGAAGGTCTCCGCTTTCACCCGTAG
GTCGTATGCGGTATTAGCGTAAGTTTCCCTACGTTATCCCCACGAAAGAGTAGATTCCGATGT
ATTCCCTACCCGTCCGCCACTCGCCACCCATAAGAGCAAGCTCTTACTGTGCTGCCGTTCGACT
TGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCACTCT

XCV 049 - UFRRJ / JQ513815 - NCBI

TTTGTGTTTGGATCCCTGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTGAACGG
CAGCACAGTAAGAGCTTGCTCTTATGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAAT
CTACTCTTTTCGTGGGGGATAACGTAGGGAAACTTACGCTAATACCGCATAACGACCTACGGGTGA
AAGCGGAGGACCTTCGGGCTTCGCGCGGTTGAATGAGCCGATGTCCGATTAGCTAGTTGGCGGG
GTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGA
GAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGCGAAGCCT
GATCCAGCCATGCCGCGTGGGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGA
AAAGCAGTCGGTTAATACCCGATTGTTCTGACGGTACCCAAAGAATAAGCACC GGCTAACTTCG
TGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTG
CGTAGGTGGTGGTTAAGTCTGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAATTGCAGTGGATAC
TGGGTCACTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCCCGGTGTAGCAGTAAAATGCGTAGAGAT
CGGGAGGAACATCCGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGACCAACACTGACACTGAGGCACGAAAGCG
TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTG
GGTGCAATTTGGCAGCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCCGCTGGGGAGTACGGTCCG
CAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTC
GATGCAACCGGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTG
CCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCTAAG
GAGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAC
CAGGGCTACACACGTACTACAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAAACCCGCGAGGGCAAGCCAAT
CCCAGAAACCTATCTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCT
AGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA
CACCATGGGAGTTTGTGACACCAGAAGCAGGTAGCTTAACTTCGGGAGGGCGCTTGCCACGGT
GTGGCCGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTG

XCV 074 - UFRRJ / JQ513816 - NCBI

GATCCTGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTGAACGGCAGCACAGT
AAGAGCTGCTCTTATGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTCTTTC
GTGGGGGATAACGTAGGGAAACTTACGCTAATACCGCATAACGACCTACGGGTGAAAGCGGAGGA
CCTTCGGGCTTCGCGCGGTTGAATGAGCCGATGTCCGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCC
ACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGA
ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCA
TGCCGCGTGGGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAAAGCAGTCG
GTTAATACCCGATTGTTCTGACGGTACCCAAAGAATAAGCACC GGCTAACTTCGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGTGGT
GGTTAAGTCTGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAATTGCAGTGGATACTGGGTCAC
TAAAGTGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCCCGGTGTAGCAGTAAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAAC
ATCCGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGACCAACACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTT
GGCAGCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCCGCTGGGGAGTACGGTCCGAAGACTGAA

ACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGC
GAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAA
CCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC
AACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCTAAGGAGACCGCCG
GTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACA
CACGTACTACAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAAACCCGCGAGGGCAAGCCAATCCCAGAAACC
CTATCTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCA
GATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCCATGGGA
GTTTGTGTCACCAGAAGCAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTGCCACGGTGTGGCCGATG
ACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGT

ENA 4597 - UFRRJ / JQ513817 - NCBI

TGATCCTGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACAG
TAAGAGCTTGCTCTTATGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTCTT
TCGTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATAACGACTACGGGTGAAAGCGGAG
GACCTTCGGGCTTCGCGCGGTTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGC
CCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACAG
GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGC
CATGCCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAAAGCAGT
CGGTTAATAACCGATTGTTCTGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGTG
GTGGTTTAAGTCTGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAATTGCAGTGGATACTGGGTAC
TAGAGTGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCCTGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGA
ACATCCGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGACCAACACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGC
AAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAAT
TTGGCACGCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTG
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAAC
GCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGG
AACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
GCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCTAAGGAGACCGC
CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTA
CACACGTACTACAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAAACCCGCGAGGGCAAGCCAATCCCAGAAA
CCCTATCTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCG
CAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCCATGG
GAGTTTGTGTCACCAGAAGCAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTGCCACGGTGTGGCCGA
TGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGGTG

ENA 4605 - UFRRJ / JQ513818 - NCBI

TGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGTAAGAG
CTTGCTCTTATGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTCTTTCGTGG
GGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATAACGACTACGGGTGAAAGCGGAGGACCTT
CGGGCTTCGCGCGGTTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCA
AGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACAGGTCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCC
GCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAAAGCAGTCCGTTA
ATACCCGATTGTTCTGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGAAGGGTGAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGTGGTGGTT
TAAGTCTGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAATTGCAGTGGATACTGGGTCACTAGAGT

GTGGTAGAGGGTAGCGGAATCCCCGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACATCC
GTGGCGAAGGCGGCTACCTGGACCAACACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG
GATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCA
CGCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTC
AAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAG
AACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCGT
GAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
AGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCTAAGGAGACCGCCGGTGA
CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACG
TACTACAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAAACCCGCGAGGGCAAGCCAATCCCAGAAACCCTAT
CTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATC
AGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTT
GTTGCACCAGAAGCAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTGCCACGGTGTGGCCGATGACTG
GGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAA