



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

**CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA E ANÁLISE GENÔMICA
DE *Xanthomonas citri*, AGENTE CAUSAL DA MANCHA
BACTERIANA DA TECA (*Tectona grandis*)**

VITÓRIA LAIZE BATISTA MONTEIRO

Brasília – DF

2020

VITÓRIA LAIZE BATISTA MONTEIRO

**CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA E ANÁLISE GENÔMICA DE *Xanthomonas citri*,
AGENTE CAUSAL DA MANCHA BACTERIANA DA TECA (*Tectona grandis*)**

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia pelo Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia

Orientador

Dr. Maurício Rossato

**BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL - BRASIL
2020**

FICHA CATALOGRÁFICA

Monteiro, Vitória Laize Batista

Caracterização polifásica e análise genômica de *Xanthomonas citri*, agente causal da mancha bacteriana da teca (*Tectona grandis*). / Vitória Laize Batista Monteiro.

Brasília, 2020.

Número de páginas p.104

Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.

1. Taxonomia – Filogenia.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Caracterização polifásica e análise genômica de *Xanthomonas citri*, agente causal da mancha bacteriana da teca (*Tectona grandis*)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Ele nada sou.

À minha família que sempre me apoiou e me estimula a ser uma ótima profissional, sem esquecer de ser primeiramente uma boa pessoa.

Agradeço aos professores da Universidade Federal de Mato Grosso e ao professor Paulo Afonso, meu orientador da graduação, pela paciência e confiança.

A todos os meus professores da Universidade de Brasília, que me concederam a oportunidade de realizar o sonho de fazer o mestrado em Fitopatologia. Obrigada por todas as lições. Serei eternamente grata!

Agradeço ao meu orientador de mestrado, professor Maurício Rossato, que me acolheu de braços abertos quando o procurei. Obrigada pela paciência, compreensão, pelo estímulo a pensar de forma crítica e por ter me permitido tomar decisões em diversas situações. Sou sua primeira orientanda, mas não tenho dúvidas de que terá uma trajetória de sucesso, porque possui dois elementos essenciais: competência e humanidade.

Agradeço ao professor Fernando Lucas Melo por todo suporte com a parte de bioinformática. A Dra. Adriane da Embrapa arroz e feijão pelos isolados BRM e IBSBF e Dra. Alice Quezado da Embrapa Hortaliças pelos isolados P-89 e P-120.

A todos os meus colegas da pós-graduação, por todos os momentos que vivenciamos. Todos vocês me ensinaram importantes lições, cada um do seu jeito. Posso dizer que tive uma ótima experiência em Brasília e vocês são em parte, responsáveis por isso.

Ao grupo de jovens da Igreja Luterana pelo acolhimento e carinho que sempre me ofereceram enquanto estive em Brasília e as amigas que fiz em casa: Juliana Verde, Iana Nunes e Carla Brasil.

A Universidade de Brasília pela oportunidade e ao CNPq pela bolsa concedida e financiamento do projeto de pesquisa.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do **Professor Maurício Rossato**, com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq).

**CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA E ANÁLISE GENÔMICA DE *Xanthomonas citri*,
AGENTE CAUSAL DA MANCHA BACTERIANA DA TECA (*Tectona grandis*)**

VITÓRIA LAIZE BATISTA MONTEIRO

DISSERTAÇÃO APROVADA em 31/08/2020 por:

Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira Da Gama

Examinador Externo

Profa. Dra. Marisa Alvares Velloso Ferreira

Examinador Interno

Prof. Dr. Maurício Rossato

Orientador (Presidente)

Profa. Dra. Rita de Cássia Pereira Carvalho

(Suplente)

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL
BRASIL
2020

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMO GERAL	vi
GENERAL ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
Objetivo geral.....	5
Objetivos específicos.....	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
Tectona grandis	6
O gênero <i>Xanthomonas</i>	10
Taxonomia e genômica de espécies de <i>Xanthomonas</i>	11
Efeitores e gama de hospedeiro.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
Obtenção da coleção	19
Teste de patogenicidade.....	20
Identificação do gênero <i>Xanthomonas</i> por PCR.....	20
Extração de DNA	21
BOX-PCR e seleção de haplótipos.....	22
Sequenciamento genômico.....	23
Montagem do genoma	23
Multilocus sequence analysis (MLSA).....	24
Average nucleotide identity (ANI).....	27
Filogenômica.....	28
Análise dos sistemas de secreção	28
Identificação de efetores TALE e regiões CRISPR.....	28
Análise de efetores SST3	28
Análise de recombinação	29
Gama de hospedeiros.....	29
Identificação de genes de insensibilidade ao cobre (cop)	30
4. RESULTADOS	31
Coleção de isolados	31
Patogenicidade	32
Identificação do gênero por PCR.....	33
Análise da diversidade de isolados de <i>Xanthomonas</i> por BOX-PCR.....	34
Sequenciamento dos genomas e características.....	36
Identificação de efetores TALE e regiões CRISPR.....	37
Multilocus Sequence Analysis (MLSA)	37
Comparação dos genomas por Average Nucleotide Identity (ANI).....	41
Filogenômica.....	44
Sistemas de secreção.....	46
Efeitores do SST3.....	46

Análise de recombinação	49
Gama de hospedeiro	51
Identificação de genes de insensibilidade ao cobre (COP)	62
5. DISCUSSÃO.....	63
6. CONCLUSÕES.....	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista dos 26 isolados de <i>Xanthomonas</i> de Mato Grosso e São Paulo que compuseram a coleção de estudo	19
Tabela 2. Espécies, isolados e acessos de <i>Xanthomonas</i> extraídas do GenBank para as análises filogenéticas	25
Tabela 3. Características gerais dos genomas de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>tectonae</i>	37
Tabela 4. Efetores mapeados no genoma de UnB-Xtec2D, coordenadas e presença ou ausência de recombinações nas regiões com efetores.	49
Tabela 5. Avaliação da presença de sintomas em plantas hospedeiras em resposta à inoculação com isolados de <i>X. citri</i> pv. <i>tectonae</i> UnB-XtecTg02(2) e UnB-XtecFFT1.....	53
Tabela 6. Isolamento de bactérias do gênero <i>Xanthomonas</i> em plantas de diferentes espécies inoculadas com dois isolados de <i>X. citri</i> pv. <i>tectonae</i> . (+):presença de colônias após isolamento e (-): ausência de colônias após isolamento.	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Folhas sintomáticas de <i>Tectona grandis</i> (teca) apresentando manchas foliares. A: viveiro de Mato Grosso (2016, 2017 e 2018). B: viveiro de São Paulo (2020).....	31
Figura 2. Colônias isoladas a partir de folhas sintomáticas de <i>Tectona grandis</i> (teca) cultivadas em meio NA a 28° C por 72h.	32
Figura 3. Produtos da PCR com os <i>primers</i> X-gumD F7/R7 visando detecção do gene <i>gumD</i> , típico de espécies de <i>Xanthomonas</i> , na coleção de isolados de teca. M: marcador DNA ladder 1 Kb plus Invitrogen. N: controle negativo. *: 100 pb.	33
Figura 4. Perfis de BOX-PCR com o <i>primer</i> BOX-A1R dos isolados de <i>Xanthomonas</i> originários de Mato Grosso e <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>fuscans</i> (BRM 48911, BRM 48898 e IBSBF 1346). M: marcador DNA ladder 1 Kb Plus Invitrogen. N: controle negativo. *: 100 pb.	35
Figura 5. Perfis de BOX-PCR com o <i>primer</i> BOX-A1R dos isolados de <i>Xanthomonas</i> originários de Mato Grosso e São Paulo e <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>fuscans</i> (BRM 48898 e IBSBF 1346). M: marcador DNA ladder 1 Kb Kasvi. N: controle negativo.....	36
Figura 6. Árvore filogenética por inferência Bayesiana, modelo GTR+G+I com sequências concatenadas de sete genes housekeeping (<i>atpD</i> , <i>dnaK</i> , <i>efp</i> , <i>fyuA</i> , <i>glnA</i> , <i>gyrB</i> e <i>rpoD</i>) de isolados de teca e demais espécies de <i>Xanthomonas</i> e <i>Xanthomonas albilineans</i> GPE PC73 como <i>outgroup</i> . Retângulo vermelho: isolados de teca deste estudo.	39
Figura 7. Árvore filogenética por inferência Bayesiana, modelo GTR+G+I, com quatro genes housekeeping (<i>dnaK</i> , <i>fyuA</i> , <i>gyrB</i> e <i>rpoD</i>) de espécies de <i>Xanthomonas</i> e <i>Xanthomonas albilineans</i> GPE PC73 como <i>outgroup</i> . Retângulo azul: isolados de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>eucalyptorum</i> . Retângulo vermelho: isolados de teca deste estudo.	40
Figura 8. Heatmap de <i>average nucleotide identity</i> (ANI) no triângulo inferior e MLSA (triângulo superior) de 61 isolados da espécie <i>Xanthomonas citri</i> . Os valores de ANI e MLSA são demonstrados pelas cores: amarelo = 96 % ANI, verde = 98 %, azul claro = 99 % e azul marinho = 100% ANI.	43
Figura 9. Árvore filogenômica de SNPs de isolados de <i>Xanthomonas</i> montada por FastTree, modelo GTR, com remoção prévia de sítios recombinantes. <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> foi usada como <i>outgroup</i>	45
Figura 10. Matriz de ausência e presença de efetores identificados em 23 genomas de <i>Xanthomonas</i> . Presença = vermelho, ausência = verde.	48
Figura 11. Regiões de recombinação no genoma de UnB-Xtec2D. Efetores em vermelho: recombinação presente. Efetores em preto: recombinação ausente.	50
Figura 12. Sintomas causados por <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>tectonae</i> em <i>Tectona grandis</i> . (A) Controle negativo (água destilada) em superfície adaxial; (B) Controle negativo (água destilada) em superfície abaxial; (C) UnB-XtecTg02(2) na superfície adaxial; (D) UnB-XtecTg02(2) na superfície abaxial; (E) UnB-XtecFFT1 na superfície adaxial; (F) UnB-XtecFFT1 na superfície abaxial; (G) Controle negativo ampliado; (H) Sintomas causados por UnB-XtecFFT1 ampliado. Digitalizações realizadas quatro semanas após inoculação.....	54
Figura 13. Sintomas causados por <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>tectonae</i> em <i>Citrus</i> spp. (A) Controle negativo (água destilada) em superfície adaxial; (B) Controle negativo (água destilada) em superfície abaxial; (C) UnB-XtecTg02(2) na superfície adaxial; (D) UnB-XtecTg02(2) na superfície abaxial; (E) UnB-XtecFFT1 na superfície adaxial; (F) UnB-	

XtecFFT1 na superfície abaxial; (G) Controle negativo ampliado; (H) Sintomas causados por UnB-XtecFFT1 ampliado. Digitalizações realizadas quatro semanas após inoculação.....	55
Figura 14. Sintomas causados por <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>tectonae</i> em <i>Eucalyptus</i> spp. (A) Controle negativo (água destilada) em superfície adaxial; (B) Controle negativo (água destilada) em superfície abaxial; (C) UnB-XtecTg02(2) na superfície adaxial; (D) UnB-XtecTg02(2) na superfície abaxial; (E) UnB-XtecFFT1 na superfície adaxial; (F) UnB-XtecFFT1 na superfície abaxial; (G) Controle negativo ampliado; (H) Sintomas causados por UnB-XtecFFT1 ampliado. Digitalizações realizadas quatro semanas após inoculação.....	56
Figura 15. Sintomas causados por <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>tectonae</i> em <i>Corymbia</i> spp. (A) Controle negativo (água destilada) em superfície adaxial; (B) Controle negativo (água destilada) em superfície abaxial; (C) UnB-XtecTg02 na superfície adaxial; (D) UnB-XtecTg02(2) na superfície abaxial; (E) UnB-XtecFFT1 na superfície adaxial; (F) UnB-XtecFFT1 na superfície abaxial; (G) Controle negativo ampliado; (H) Sintomas causados por UnB-XtecFFT1 em maior aumento. Digitalizações realizadas quatro semanas após inoculação.	57
Figura 16. Sintomas causados por <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>tectonae</i> em <i>Phaseolus</i> spp. (Feijão preto). (A) Controle negativo (água destilada) em superfície adaxial; (B) Controle negativo (água destilada) em superfície abaxial; (C) UnB-XtecTg02(2) na superfície adaxial; (D) UnB-XtecTg02(2) na superfície abaxial; (E) UnB-XtecFFT1 na superfície adaxial; (F) UnB-XtecFFT1 na superfície abaxial; (G) Controle negativo ampliado; (H) Sintomas causados por UnB-XtecTg02(2) ampliado. Digitalizações realizadas quatro semanas após inoculação.....	58
Figura 17. Sintomas causados por <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>tectonae</i> em <i>Phaseolus</i> spp. (Feijão carioca). (A) Controle negativo (água destilada) em superfície adaxial; (B) Controle negativo (água destilada) em superfície abaxial; (C) UnB-XtecTg02(2) na superfície adaxial; (D) UnB-XtecTg02 na superfície abaxial; (E) UnB-XtecFFT1 na superfície adaxial; (F) UnB-XtecFFT1 na superfície abaxial; (G) Controle negativo ampliado; (H) Sintomas causados por UnB-XtecTg02(2) em maior aumento. Digitalizações realizadas quatro semanas após inoculação.....	59
Figura 18. Sintomas causados por <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>tectonae</i> em <i>Vigna unguiculata</i> (Feijão caupi cv. Guariba). (A) Controle negativo (água destilada) em superfície adaxial; (B) Controle negativo (água destilada) em superfície abaxial; (C) UnB-XtecTg02(2) na superfície adaxial; (D) UnB-XtecTg02(2) na superfície abaxial; (E) UnB-XtecFFT1 na superfície adaxial; (F) UnB-XtecFFT1 na superfície abaxial; (G) Controle negativo ampliado; (H) Sintomas causados por UnB-XtecTg02(2) ampliado. Digitalizações realizadas quatro semanas após inoculação.	60
Figura 19. Produto da PCR com os <i>primers</i> X-gumD F7/R7 visando detecção do gene <i>gumD</i> (402 pb) obtidos após gama de hospedeiras. M: marcador DNA ladder 1 Kb Ludwig. N: controle negativo	61
Figura 20. Produto da PCR com os <i>primers</i> X-gumD F7/R7 visando detecção do gene <i>gumD</i> (402 pb) obtidos após gama de hospedeiras. M: marcador DNA ladder 1 Kb Ludwig. N: controle negativo. Neg.: plantas do controle negativo. Fpreto: feijão preto. Fcarioca: feijão carioca. Fcaupi: feijão caupi.	61
Figura 21. Produto da PCR com os <i>primers</i> copAF/AR visando detecção do gene <i>copA</i> , (870 pb) na coleção de isolados de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>tectonae</i> . P-89: isolado sensível ao cobre. P-120: isolado insensível ao cobre. M: marcador DNA ladder 1 Kb Ludwig. N: controle negativo.....	62

RESUMO GERAL

MONTEIRO, Vitória Laize Batista. **Caracterização polifásica e análise genômica de *Xanthomonas citri*, agente causal da mancha bacteriana da teca (*Tectona grandis*).** 2020. 104p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Teca (*Tectona grandis*) é uma espécie florestal nativa de florestas tropicais na Ásia que pertence a família Lamiaceae. É apreciada pela qualidade da madeira, durabilidade e resistência à pragas e doenças. Sua madeira pode ser utilizada em construções exteriores, barcos, navios e construções marinhas, esculturas e móveis. Há mais de 90.000 hectares de teca plantados no Brasil. Apesar da resistência natural, pragas e doenças podem afetar seu estabelecimento, crescimento e qualidade da madeira, como aquelas causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus. Nesse contexto, bactérias fitopatogênicas foram isoladas de mudas de teca de viveiro em Rosário Oeste, Mato Grosso - Brasil e Garça – São Paulo. O objetivo deste trabalho foi identificar o gênero das bactérias causadoras da mancha foliar em teca por *primer* específico e analisar a diversidade de 26 isolados de *Xanthomonas* de teca por meio do marcador BOX-PCR e identificar o agente causal por meio do sequenciamento do genoma, *multilocus sequence analysis* (MLSA) utilizando-se sete genes *housekeeping*: *atpD*, *dnaK*, *efp*, *fyuA*, *glnA*, *gyrB* e *rpoD*, *average nucleotide identity* (ANI), filogenômica com SNPs (*single nucleotide polymorphism*), repertório de efetores e identificação de genes de resistência ao cobre. O sequenciamento de dois genomas dos isolados de teca demonstrou não haver plasmídeos, genes TAL e regiões CRISPR. O tamanho corresponde ao esperado para o gênero *Xanthomonas* e conteúdo G+C: 64,6%. MLSA e ANI revelaram que os isolados de *Xanthomonas* de teca pertencem à espécie *Xanthomonas citri* e foram filogeneticamente próximas de bactérias isoladas de *Phaseolus* spp. A análise filogenômica também confirmou a espécie *X. citri*, porém os isolados foram geneticamente mais próximos de bactérias isoladas de *Citrus* spp. Os isolados de *Xanthomonas* de teca são descritos aqui como *Xanthomonas citri* pv. *tectonae*. A análise de sistemas de secreção e efetores revelou que *X. citri* pv. *tectonae* possui todos os sistemas de secreção encontrados em bactérias gram-negativas e possuem um repertório de 25 efetores. Além disso, os isolados não possuem genes de resistência ao cobre, indicando a possibilidade de utilizar compostos de cobre no controle de *X. citri* pv. *tectonae*.

Palavras-chave: filogenia, genoma bacteriano, *multilocus sequence analysis*, taxonomia

Orientador – Dr. Maurício Rossato – Universidade de Brasília

GENERAL ABSTRACT

MONTEIRO, Vitória Laize Batista. **Polyphasic characterization and genomic analysis of *Xanthomonas citri*, causal agent of bacterial spot disease in teak (*Tectona grandis*).** 2020. 104p. Dissertation (Master in Plant Pathology – Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil

Tectona grandis or teak is a forest species, native to tropical forests in Asia, and belongs to the Lamiaceae family. It is appreciated by its high-quality timber, durability and resistance against pests and diseases. Its wood may be used for exterior construction, boats, ships, marine building, carving and furniture. There are over 90,000 hectares of teak planted in Brazil. Despite its natural resistance, pests and plant diseases may affect its establishment, growth and wood quality, as plant diseases caused by fungi, bacteria, nematodes and viruses. In this context, plant pathogenic bacteria were isolated from teak seedlings from nurseries in Rosário Oeste, Mato Grosso - Brasil and Garça – São Paulo. The aim of this work was to identify the species of bacteria causing leaf spot on teak by specific *primer* and to analyze diversity of 26 *Xanthomonas* strains through BOX-PCR marker and to identify the causative agent through genome sequencing, phylogenetic analysis with *multilocus sequence analysis* (MLSA) using seven *housekeeping* genes: *atpD*, *dnaK*, *efp*, *fyuA*, *glnA*, *gyrB* e *rpoD*, *average nucleotide identity* (ANI) and SNPs (*single nucleotide polymorphism*) phylogenomic, effectors repertoire and identification of copper resistance genes. The sequencing genome from teak *strains* demonstrated there is no plasmids, TAL genes and CRISPR regions. *Multilocus sequence analysis* and *average nucleotide identity* have revealed *Xanthomonas* strains from teak belong to *Xanthomonas citri* species and are closely related to bacteria isolated from *Phaseolus* spp. The phylogenomic analysis also confirmed *X. citri* species, however strains were genetically closer from strains isolated from *Citrus* spp. *Xanthomonas* strains from teak are described here as *Xanthomonas citri* pv. *tectonae*. Secretion system analysis and effector analysis show *X. citri* pv. *tectonae* has all secretion systems found in gram-negative bacteria and a repertoire with 25 effectors. Moreover, strains from *X. citri* pv. *tectonae* do not have *cop* genes, copper resistance genes, becoming its control possible in greenhouses through copper-based compounds.

Keywords: bacterial genome, multilocus sequence analysis, phylogeny, taxonomy

Master's advisor – Dr. Maurício Rossato – Universidade de Brasília

1. INTRODUÇÃO

A teca (*Tectona grandis* Linn f.) é uma árvore nativa das florestas tropicais do Sudeste da Ásia e teve seu plantio expandido para zonas tropicais como a África Ocidental, América Central e América do Sul, especialmente na Costa Rica e Brasil. Cresce naturalmente entre latitudes de 23 a 10 N e pode atingir até 60 metros de altura (Weaver 1993, Figueiredo e de Sa 2015).

A madeira da teca é uma das madeiras tropicais mais valiosas e mais conhecidas, pois possui propriedades físicas desejáveis: naturalmente durável, altamente estável, moderadamente pesada, fácil de trabalhar e esteticamente bonita, sendo utilizada em construções navais, equipamentos externos, móveis e carpintaria em geral (Miranda et al. 2011).

O cultivo de teca está concentrado principalmente na Ásia e as Américas, responsáveis por 6% da produção (Kollert e Kleine 2018). O Brasil tem cerca de 93.000 hectares de teca plantados (Ibá 2019) e aqui seu cultivo teve início no final dos anos 60 em Cáceres, uma cidade do estado de Mato Grosso, na qual as condições de clima se aproximam àquelas dos países de origem da teca (Tsukamoto Filho et al. 2003).

Vários fatores bióticos podem interferir na produção da teca, sendo uma cultura alvo de muitos insetos praga e doenças. Alguns patógenos tem sua importância reconhecida por causarem sérios problemas em viveiros como murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* e manchas foliares causadas por diversas espécies de fungos (Lee 2003), com frequentes novos relatos de acordo com a expansão da área cultivada com essa espécie. Ainda existe significativa pobreza de informação quanto aos danos e perdas que os fitopatógenos podem causar nessa cultura.

O quadro de doenças fúngicas no mundo é extenso, podendo-se listar podridão de raiz, manchas foliares, murchas e cancrios (Mohd Farid et al. 2005, Daly et al. 2006, Huang et al. 2017) . No Brasil há vários relatos de doenças fúngicas, como as causadas pelas espécies *Olivea tectonae*, *Ceratocystis fimbriata*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Fusarium oxysporum* (Cabral et al. 2010, Firmino et al. 2012, Borges et al. 2015, Borges et al. 2018b).

No caso de vírus, há apenas um caso registrado no Brasil em 2018. Mudas exibindo sintomas de amarelecimento internerval em mudas jovens testaram positivo para *Tomato Chlorosis Virus* (ToCV) nas quais também notou-se a presença de moscas-brancas, inseto vetor desse fitopatógeno (Borges et al. 2019a). Silva et al. (2008) fez um levantamento de fitonematoides em áreas com cultivo de teca, onde encontrou *Meloidogyne javanica* causando a morte de algumas plantas (Oliveira e Silva 2013). Dutra et al. (2006) relata gêneros importantes ocorrendo em mudas da espécie como: *Pratylenchus brachyurus*, *Aphelenchoides* spp. e *Rotylenchus reniformes*, mas chama atenção para o fato da teca ser uma boa hospedeira para *M. exigua*.

Entre as bacterioses já descritas, pode-se citar a espécie *Ralstonia solanacearum*, relatada desde o passado infectando a cultura (Smith 1914), causando sintomas de murcha e queima foliar (Lee 2003). No Brasil, a murcha bacteriana não foi relatada em periódicos acadêmicos, porém é conhecida entre os produtores brasileiros. Galha da coroa causada por *Agrobacterium tumefaciens* foi relatada causando o sintoma típico de galhas na base da planta, porém na publicação não existe informação sobre estado ou município (Borges et al. 2019b). *Erwinia* spp. também foi relatada causando problemas na América Central, porém com pouca informação sobre sintomas ou outros aspectos (Arguedas 2011). Em 2018, *Xanthomonas fuscans* foi relatada causando sintomas de manchas pequenas, necróticas com halo amarelo

circundando em plantas de um mini jardim clonal no Estado de Mato Grosso. Após o isolamento foi confirmada a etiologia, porém sabe-se pouco sobre essa *Xanthomonas* (Borges et al. 2018c).

Xanthomonas é um gênero de bactérias gram-negativas amplamente distribuída e são reconhecidas por causarem doenças em diversos hospedeiros vegetais (Leyns et al. 1984). São caracterizadas pela coloração amarelada resultante de um pigmento, a xantomonadina (Starr e Stephens 1964). Porém, destaca-se que algumas espécies não apresentam pigmentação como *X. axonopodis* pv. *manihotis* (Bezerra et al. 2017). É um gênero com ampla diversidade genética e a taxonomia tem sofrido mudanças ao longo dos anos (Vauterin et al. 1995, Constantin et al. 2016, Timilsina et al. 2020).

Young et al. (1978) propôs uma alteração na lista de espécies de *Xanthomonas* publicada por Dye e Lelliot em 1974, no qual havia apenas cinco espécies reportadas, incluindo *Xanthomonas campestris*. Os autores sugerem o termo patovar para diferenciar isolados que se diferenciam por patogenicidade em hospedeiros. Patovar é uma classificação infra-subespecífica e muito utilizada em situações em que um isolado é de uma mesma espécie, divergindo somente no seu círculo de hospedeiras (Young et al. 2001). Em 1995 após um estudo de hibridização DNA-DNA realizado por Vauterin et al. (1995) com 183 isolados do gênero *Xanthomonas*, várias patovares de *X. campestris* foram realocadas em *Xanthomonas axonopodis*. Outros estudos foram feitos desde então para diferentes grupos: (Jones et al. 2004, Schaad et al. 2005, Young et al. 2008, Constantin et al. 2016, Timilsina et al. 2019a, Morinière et al. 2020).

O gênero conta com mais de 35 espécies (Kaster 2020) infectando importantes culturas como arroz (Swings et al. 1990), feijão (Weller e Saettler 1980), tomate (Cook e Stall 1969, Osdaghi et al. 2017), citrus (Brunings e Gabriel 2003), cana de açúcar (Rott et al. 1995, Sun et

al. 2017), banana (Ndungo et al. 2006), mandioca (Verdier et al. 1994), manga (Robbs et al. 1978, Pruvost et al. 2011), brássicas (Jensen et al. 2010) e muitas outras.

Objetivo geral

Analisar o posicionamento taxonômico de isolados causadores da mancha bacteriana da teca por meio de uma caracterização polifásica e estudo de gama de hospedeiros, também avaliando a sensibilidade ao cobre.

Objetivos específicos

- Estabelecer uma coleção de isolados bacterianos causadores da mancha bacteriana da teca;
- Analisar a diversidade genética da coleção dos isolados associados à mancha bacteriana em mudas de teca por meio de marcador molecular BOX-PCR;
- Sequenciar o genoma completo de isolados representativos da coleção de estudo;
- Identificar por métodos filogenéticos e genômicos a espécie do agente causal da mancha bacteriana da teca;
- Analisar os genomas dos isolados sequenciados para caracterizar fatores de patogenicidade que podem estar associados com a capacidade de infectar teca;
- Determinar o círculo de hospedeiras dos isolados capazes de infectar teca;
- Investigar a sensibilidade ao cobre *in silico* dos isolados que infectam teca por análise genômica visando inferir sobre a possibilidade de controle desta bacteriose em condições de viveiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Tectona grandis

Tectona grandis é uma planta pertencente à família Lamiaceae, após sua realocação original vinda da família Verbenaceae (Cantino et al. 1992, Li e Olmstead 2017). Sua distribuição natural é limitada ao sudeste asiático, sendo indígena à Península indiana e em países como Burma, Tailândia e Laos (Troup 1921, Kaosa-ard 1981), mas estabeleceu-se na Ásia tropical, África tropical, América Latina e Caribe (Pandey e Brown 2000).

Teca é uma árvore grande e caducifólia capaz de ultrapassar 30 metros de altura quando em condições favoráveis. As folhas são simples, opostas, raramente alternadas, sendo brilhosas na superfície adaxial e pilosas na superfície abaxial. Sua casca é marrom com rasas fissuras longitudinais e o sistema radicular pouco profundo, frequentemente não ultrapassando 50 cm de profundidade, característica compensada pelas raízes laterais que podem se estender até 15 metros a partir do caule. As flores são pequenas, cerca de 8 mm de diâmetro, variando a coloração do amarelo ao branco, arranjadas em panícula. O fruto, drupa que possui quatro câmaras nas quais as sementes se desenvolvem, são verdes no início e marrons na maturidade (Orwa et al. 2009).

Nos trópicos é considerada uma das madeiras de maior valor. Extensivamente usada na construção naval, para a fabricação de móveis, esculturas e muitos outros propósitos. O seu valor se deve a leveza juntamente com força, estabilidade, durabilidade, fácil manuseio, ser desprovida de rachaduras e apresentar resistência a cupins, resistência as intempéries e possuir a propriedade de não sofrer corrosão. Suas propriedades físicas e mecânicas se igualam ou até superam as madeiras de clima temperado (Kaosa-ard 1981).

Tem preferência por clima tropical quente e úmido, suportando temperaturas entre 13-44 °C e precipitação ideal variando de 1.200 a 2.500 mm. Os solos arenosos, profundos e bem

drenados propiciam seu melhor desenvolvimento, assim como pH de neutro a alcalino. É exigente quanto cálcio no solo e com elevada demanda por a luz (Kaosa-ard 1981, Dotaniya et al. 2013).

A floresta plantada de teca ocupa cerca de 4,35 a 6,89 milhões de hectares, sendo a Ásia responsável por mais de 80% da produção com Índia, Indonésia e Myanmar como principais produtores, enquanto a África produz cerca de 10% e as Américas 6%. Anualmente, colhe-se entre 2 a 2,5 milhões de metros cúbicos em florestas naturais e implantadas, com capacidade para produzir mais (Kollert e Kleine 2018).

A introdução da teca no Brasil ocorreu em 1968 e o plantio em escala comercial teve início em 1971 pela empresa Cáceres Florestal S/A na cidade de Cáceres, estado de Mato Grosso. A cultura sobressaiu-se em Mato Grosso devido a rusticidade e crescimento rápido em altura, com um ciclo de corte de 25 anos no Estado, enquanto em outros países onde é nativa, necessita-se de 60 a 100 anos (Florestal 2006).

O Brasil possui cerca de 7,84 milhões de hectares plantados com árvores, dos quais seu uso destina-se a indústria de celulose, papel, painéis de madeira, piso laminado e carvão vegetal, gerando uma receita bruta de 73,8 bilhões de reais. A área plantada de teca cresce continuamente, passando de 67.693 ha plantados em 2012, para 93.957 ha em 2018 (Ibá 2019).

A redução da produção pode ter várias razões, desde condições edafoclimáticas não favoráveis como também por uma gama de pragas e doenças, podendo não somente reduzir a produção como prejudicar a qualidade da madeira e comercialização (Dotanyia et al., 2013).

Mais de 100 insetos são relatados como associados a cultura, sendo que na Índia, duas espécies são bem conhecidas como pragas em cultivos de teca: *Hyblaea puera* e *Eutectona machaeralis*, ambos da ordem Lepidoptera (Nair 1988). No Brasil encontra-se principalmente: o cupim do solo [*Syntermes molestus*, (Burmeister)], grilo-comum (*Gryllus assimilis* Fabricius),

lagarta-rosca (*Agrotis repleta* Walker), saúva-limão (*Atta sexdens rubropilosa* Forel), lagarta-da-teca (*Hyblaea puera* Cramer) e coleobrocas (Silva et al. 2013).

Entre os fitopatógenos fúngicos, *Olivea tectonae*, fungo causador da ferrugem em teca, foi relatado pela primeira vez no Brasil em 2010 em mudas de teca ornamentais infectando folhas e inflorescências em Minas Gerais e Espírito Santo e no ano seguinte em Mato Grosso. Em 2011, detectou-se a doença novamente no Mato Grosso, agora com novos relatos no Maranhão, Tocantins e São Paulo. As manchas foliares começam com pequenos pontos que necrosam, coalescem e dão à folha um aspecto de queima, com urediniósporos na superfície abaxial (Cabral et al. 2010, Bonaldo et al. 2011, Pieri et al. 2011). Após as primeiras ocorrências, foram registradas novamente em Tocantins, mas também no Amazonas, Goiás e Sergipe (Bonaldo et al. 2011, dos Santos et al. 2011, Gasparotto e Pereira 2013, Marques et al. 2015, Mesquita et al. 2016).

Em 2008, Poltronieri et al. (2008) coletou folhas com lesões foliares inicialmente pequenas, verdes e úmidas que aumentavam de tamanho gerando necrose irregular no limbo e constataram *Rhizoctonia solani* como agente causal. Em 2009 Rondon et al. (2009) diagnosticaram *Colletotrichum* spp. causando lesões necróticas que acompanhavam as nervuras na face abaxial, sintoma típico do gênero.

Murcha foi relatada sendo causada por dois patógenos no país: primeiramente *Ceratocystis fimbriata* em 2012 e *Thielaviopsis basicola* em 2014 (Firmino et al. 2012, Borges et al. 2014). A infecção provocada por *C. fimbriata* ocorre por meio das raízes atingindo o colo, no qual o fungo se desloca no xilema após a penetração no sentido radial. Os sintomas observados iniciam pela murcha da copa, galhos, brotações até progredir para a planta inteira. Devido a morte do câmbio vascular, pode-se notar depressão na casca e descoloração interna (Ferreira et al. 2013). Em 2015, Borges et al. (2015) observaram árvores apresentando

exsudação de uma resina viscosa, além de descoloração do tecido vascular, podridão central e queima das folhas e por meio de isolamento e postulados de Koch, foi constatado *Lasiodiplodia theobromae* como agente causal do cancro em teca.

Phomopsis sp. foi relatada ocorrendo no Brasil pela primeira vez em 2012 no estado de Mato Grosso e em 2018 em Sergipe, afetando folhas e brotos jovens. Nas folhas, a coloração marrom predomina no limbo, levando à necrose generalizada (dos Santos et al. 2018).

Identificado em 2018, somente registrado no estado de Mato Grosso, *Paramirothecium roridum* provoca manchas foliares com bordas bem definidas e frequentemente causa desfolha, atraso no crescimento e desenvolvimento das plantas. Em 2018, *Fusarium oxysporum* foi registrado no Brasil ocasionando murcha vascular, além de sintomas como escurecimento do cerne, alborno, amarelecimento de folhas e abscisão foliar (Borges et al. 2018a, Borges et al. 2018b)

As espécies do gênero *Meloidogyne* como *Meloidogyne arenaria*, *M. javanica* e *M. exigua* são relatadas causando sintomas de galhas e deficiência nutricional em plantas de teca, tanto em plantios como em teste de patogenicidade e hospedabilidade (Dutra et al. 2006, de Araújo Filho et al. 2012, Oliveira e Silva 2013). Apesar de Silva et al. (2008) não relatarem os sintomas em áreas com implantação de teca, descrevem a ocorrência de *M. javanica* em solos e raiz.

O único relato de doença causada por vírus no país foi feito em 2019 por Borges et al. (2019a), no qual detectou-se em mudas sintomáticas de teca em plantio no Distrito Federal, o *Crinivirus* da espécie *Tomato Chlorosis Virus*. No mesmo estudo foi registrada a presença do vetor responsável pela transmissão, *Bemisia tabaci*.

Doenças bacterianas também podem ocorrer e causar perdas na cultura da teca no Brasil e no mundo. Entre essas, o primeiro relato de bacteriose é de 1914, quando Erwin Smith

observou que plantas de teca, que estavam entre plantas de tabaco, apresentavam sintomas típicos de murcha. O isolamento levou a identificação de *Pseudomonas solanacearum*, renomeada mais tarde para *Ralstonia solanacearum* (Smith 1914). Essa mesma bacteriose foi registrada em um levantamento feito nas florestas de Java causando doença em *T. grandis* (Ismail e Anggraeni 2008), mas também em viveiros causando podridão no cotilédono, podridão no colo, murcha de plântulas e murcha vascular em plantios jovens na Índia (Mohan 2009). *Xanthomonas axonopodis* pv. *melhusii* foi isolada a partir de *T. grandis* na Índia em 1950 (Patel et al. 1952). Em 2010, Islam et al. (2010) isolou cepas de *Agrobacterium tumefaciens* em galhas de diferentes dicotiledôneas, incluindo *T. grandis* em Bangladesh, Índia.

Há apenas duas doenças de origem bacteriana relatadas no Brasil. *Agrobacterium tumefaciens* foi registrada causando galhas típicas na região do colo de plantas em Mato Grosso em 2018, e *Xanthomonas fuscans*, isolada a partir de manchas necróticas com halo amarelo em mudas de um mini jardim clonal no estado de Mato Grosso (Borges et al. 2018c, Borges et al. 2019b).

O gênero *Xanthomonas*

O gênero *Xanthomonas* foi proposto por Dowson em 1939 e possui as seguintes características: as células bacterianas são gram-negativas e baciliformes, ligeiramente curvadas com tamanho variando de 0,2-0,6 µm por 0,8-2,9 µm e ocorrem principalmente sozinhas ou em pares. Não formam esporos e as células são circundadas por um polissacarídeo extracelular, a goma xantana e são em sua maioria móveis, devido a presença de um flagelo polar. Grande maioria das *Xanthomonas* produzem pigmentos amarelos e insolúveis em água

(xantomonadinas) quando são cultivadas, variando a cor da colônia conforme envelhecem (Dowson 1939, Swings et al. 1993).

O gênero é encontrado normalmente associado a plantas e várias espécies infectam plantas em todo o mundo. Os sintomas dominantes são: lesões necróticas em folhas, ramos e frutos, também manchas, estrias e cancos, murchas (infecções vasculares), apodrecimentos e hiperplasias. Além de infectar o hospedeiro principal, podem associar-se a hospedeiros alternativos, estes contribuindo para a sobrevivência destas bactérias e servindo como fonte de inóculo para infecções posteriores ao hospedeiro principal. Pelo menos 124 espécies de monocotiledôneas e 268 espécies de dicotiledôneas são infectadas por bactérias do gênero *Xanthomonas* (Starr 1981, Leyns et al. 1984).

Taxonomia e genômica de espécies de *Xanthomonas*

A classificação de bactérias por características fenotípicas é um critério considerado acessível e tradicional. No entanto, essa abordagem não é capaz de diferenciar organismos geneticamente distantes com características fenotípicas similares (Johnson e Chen 1995).

A taxonomia bacteriana configura-se como um problema na microbiologia até os dias atuais (Timilsina et al. 2019a, Morinière et al. 2020). Nos últimos tempos, surgiu a taxonomia polifásica na qual integra-se diferentes formas de dados, como informações fenotípicas, genotípicas e filogenéticas. Para o gênero *Xanthomonas*, estudos de hibridização de DNA, sequências de RNA ribossomal 16S, porcentagem G+C e características fenotípicas são algumas das técnicas empregadas na taxonomia polifásica. Os avanços dos últimos anos ocorreram principalmente quanto a genômica e filogenia, sendo esta última um procedimento de rotina na taxonomia de bactérias (Vandamme et al. 1996, Gillis et al. 2001, Chun et al. 2014).

Entre as técnicas moleculares utilizadas para estudar as relações entre isolados pode-se citar *fingerprinting* de plasmídeo, ribotipagem, AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), RAPD (*random amplified polymorphic*), RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), rep-PCR, repetições únicas de sequências e PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*) (Heras et al. 2016).

Técnicas de *fingerprinting* genômico como rep-PCR podem ser usadas para determinar a diversidade bacteriana e a estrutura filogenética de populações bacterianas, apresentando alta correlação com a homologia DNA-DNA (Rademaker et al. 2000). Paiva et al. (2018) avaliou a diversidade de bactérias causadoras do crestamento bacteriano comum em feijão por meio de rep-PCR. As técnicas geraram: sete, cinco e oito haplótipos para os marcadores BOX, REP e ERIC, respectivamente. Lee et al. (2008) identificou e diferenciou isolados iranianos causadores do cancro cítrico por meio de rep-PCR.

A análise das sequências do gene ribossomal 16S (rRNA) é um método de identificação universal de bactérias por possuir diversas características que o fazem um marcador interessante: está presente em todas as bactérias; sua função é constante mesmo com mutações que possam ocorrer; seu tamanho é grande o bastante e contém informações relevantes na sequência (Patel 2001). O gene ribossomal é altamente conservado dentro do mesmo gênero e espécie (Woo et al. 2008). Entretanto, a região 16S não resolve suficientemente as questões filogenéticas a nível de espécie. Para aumentar a resolução, uma alternativa é realizar análises com regiões que codificam para proteínas, contudo um único gene não reflete a história filogenética e análises baseadas em múltiplos genes que codificam para proteínas foram introduzidas para minimizar o viés acometido pelo uso de um gene só (Glaeser et al. 2015).

O maior conhecimento a respeito do DNA e o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular contribuíram para que bactérias fossem melhor classificadas pela comparação de

seus genomas (Krieg 1988). De acordo com Wayne, abordagens que envolvem a reassociação de sequências de DNA são o padrão para a definição de espécies bacterianas. O DNA é um padrão para determinar a filogenia, e esta, a taxonomia. Assim, dois organismos são considerados da mesma espécie filogenética se obtiverem um valor de 70% ou superior de reassociação na hibridização DNA-DNA com 5 °C ou menos ΔT_m (Wayne et al. 1987). Entretanto, mesmo o método de hibridização DNA-DNA sendo um inequívoco “padrão de ouro” para a definição de novas espécies, tem inconvenientes como gasto de tempo, dinheiro e ser laborioso (Janda e Abbott 2007). Alternativas ao método de DDH são: DDH *in silico* (Auch et al. 2010) e o uso do ANI, *Average Nucleotide identity*. O segundo método tem o mesmo fundamento do método de hibridização DNA-DNA, mas utiliza sequências de DNA que podem ser recuperadas de banco de dados. Além disso, o resultado do ANI concorda com o de DDH e os 70% em DDH equivalem a 95%-96% em ANI (Richter e Rosselló-Móra 2009).

Em 1995 foram publicados os primeiros genomas bacterianos sequenciados (Fleischmann et al. 1995, Fraser et al. 1995). Sequenciamentos posteriores mostraram o quanto a diversidade encontrada nos genomas era vasta e maior do que se esperava, existindo grande variação até mesmo dentro da mesma espécie devido a diversos mecanismos (Binnewies et al. 2006, Land et al. 2015). *Xylella fastidiosa* foi a primeira bactéria fitopatogênica a ter o genoma sequenciado (Simpson et al. 2000) e desde então diversas espécies foram sequenciadas (Salanoubat et al. 2002, Monteiro-Vitorello et al. 2004, Feil et al. 2005). No início, o genoma era utilizado para responder perguntas fundamentais para a pesquisa como a evolução das bactérias. Entretanto, com o desenvolvimento de tecnologias de alta performance, montagem das sequências em computador, inferência funcional e análise genômica, as sequências agora são uma importante ferramenta para a bacteriologia (Fournier et al. 2007). O sequenciamento do genoma pode indicar a troca de DNA entre estirpes, como indicado por Aritua et al. (2015) no qual há genes

idênticos sendo compartilhados por organismos relativamente distantes geneticamente, sugerindo uma recente aquisição por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* a partir de *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*.

A plataforma Illumina é a mais utilizada atualmente nos estudos de genômica bacteriana. Entretanto, por se tratar de uma tecnologia de *short reads*, mesmo entregando um genoma curado, dificilmente conseguirá entregá-lo completo. Tecnologias que geram sequências com *long reads* apresentam um custo maior por base sequenciada e uma maior taxa de erros, mas como geram sequências de kilobases, permite a montagem completa do genoma e permite conhecer sua estrutura (Wick et al. 2017a, Wick et al. 2017b).

Apesar do volume de dados disponível, é necessário haver critérios para a seleção dos genes que serão utilizados nas análises filogenéticas. O primeiro deles é: genes que não estejam sujeitos a transferência horizontal gênica (THG) ou sujeitos, mas à uma baixa taxa, assim aceita-se genes *housekeeping*, ou seja que sejam componentes chave de funções metabólicas básicas ou estruturais; única cópia no genoma; independência genética frente a outros genes candidatos para a análise, a fim de evitar genes que possam sofrer THG; o gene deve estar presente em todos os isolados. Usar mais de um gene tem precisão superior em relação a apenas um gene e genes que codificam proteínas tem poder em predizer relações filogenéticas de forma acurada (Zeigler et al. 2003, De Vos 2011).

Até o momento, maio de 2020, há cerca de 27.235 genomas de espécies de bactéria disponíveis no banco de dados Genbank. Para *X. citri* há 196 genomas sequenciados, sendo 78 completos e 118 incompletos (NCBI, 2020).

A espécie causadora do cancro cítrico, *X. citri*, passou por algumas mudanças em sua taxonomia, sendo dividida em dois grupos filogeneticamente distantes e dentro de cada grupo há subgrupos que são separados com base na gama de hospedeiro. *Xanthomonas citri*,

responsável pelo cancro asiático, foi nomeada no passado como *X. campestris* pv. *citri* (Dye et al. 1980), *X. axonopodis* pv. *citri* (Vauterin et al. 1995) e *X. citri* pv. *citri* (Constantin et al. 2016). O outro grupo, sul americano, foi nomeado *X. campestris* pv. *citri* (Dye et al. 1980), *X. campestris* pv. *aurantifolii* (Gabriel et al. 1989) e *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* (Vauterin et al. 1995). Schaad et al. (2005) propuseram que a variante fuscans como em *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* fosse elevada a status de espécie e que a diferenciação das fuscans ocorresse por subespécies, renomeando *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* como *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* para designar o agente relacionado a citrus e *X. fuscans* subsp. *fuscans* para isolados de feijão. Constantin et al. (2016) estudando *X. axonopodis* pv. *dieffenbachie* separa diversas *X. citri* por filogenia, sugerindo a alteração de *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* para *X. citri* pv. *aurantifolii* e *X. fuscans* subsp. *fuscans* em *X. citri* pv. *fuscans*.

Em 2009, Pieretti et al. (2009) realiza um estudo com *Xanthomonas albilineans* no qual utiliza sete genes *housekeeping* para a análise filogenética por MLSA: *gyrB*, *groEL*, *recA*, *dnaK*, *efp*, *atpD* e *glnA* no qual observa a proximidade desta com *Xylella fastidiosa*, sendo as duas portadoras de genomas reduzidos. Em 2015, os mesmos genes são utilizados para estudar uma bactéria com características de patogenicidade, culturais e bioquímicas semelhantes à *X. albilineans* (Pieretti et al. 2015). Quatro anos depois, a identificação filogenética de *X. albilineans* é estudada utilizando-se apenas cinco genes: *gyrB*, *abc*, *rpoD*, *atpD* e *glnA* (Ntambo et al. 2019).

Ngoc et al. (2010) estudou a relação entre duas espécies que infectam citrus por meio de MLSA: *X. citri* pv. *citri* e *X. campestris* pv. *bilvae* e observou que a segunda é próxima do isolado tipo de *X. citri*, propondo a mudança desta para a espécie *X. citri* que permanece atualmente. Em 2016, Constantin et al. (2016) revisa a taxonomia de *Xanthomonas axonopodis*

pv. *diffenbachie* por meio de MLSA, DDH e ANI e propõe alterações para espécies como *Xanthomonas citri*, *Xanthomonas phaseoli* e *Xanthomonas axonopodis*.

Segundo Constantin et al. (2016), *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *mandiferaindicae*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*, *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*, *X. fuscans* subsp. *fuscans* estão incluídas dentro de *Xanthomonas citri*.

Efetores e gama de hospedeiro

Bactérias, assim como outros seres, desenvolveram sistemas dependentes de contato para entender o que acontece ao redor. Esses sistemas realizam sinalização intracelular e liberação de proteínas efetoras. Até o momento há sete sistemas descritos em bactérias. Os sistemas III, IV, V e VI são estruturas localizadas na superfície da célula bacteriana no qual fazem contato com a célula alvo e liberam DNA ou proteínas (Hayes et al. 2010).

O sistema de secreção do tipo I (SST1) encontrado em gram-negativas secretam substratos que podem ser enzimas digestivas como proteases, lipases e/ou também adesinas (Green e Mecsas 2016). As exoproteínas do SST2 são enzimas hidrolíticas que degradam biopolímeros como carboidratos, lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e secretam toxinas e adesinas (Nivaskumar e Francetic 2014). O SST4 é classificado em 3 subgrupos: 1) sistema de conjugação que transporta DNA e é dependente de contato célula a célula contribuindo para a adaptação da bactéria ao ambiente; 2) absorção e liberação de DNA e não é dependente de contato célula a célula; 3) sistema que transloca efetores na célula hospedeira, tais como fatores de virulência. É um sistema versátil que se torna único pelo fato de transportar ácido nucleico e proteínas (Cascales e Christie 2003, Trokter et al. 2014) . O SST5 não possui um aparato para transportar o substrato, pois o substrato possui um domínio que facilita o próprio transporte,

sendo a função do substrato principalmente relacionada à virulência (Desvaux et al. 2004). O SST6 consiste de um complexo de proteínas com estrutura similar à estrutura contrátil de um fago em forma de bainha usado para realizar a entrega de efetores, contribuindo para o antagonismo entre as bactérias (Russell et al. 2011, Basler et al. 2012, Basler et al. 2013). O SST7 encontrado em bactérias gram-positivas ainda não tem seu papel inteiramente caracterizado, mas sugere-se sua participação na competição bacteriana (Cao et al. 2017, Lopez e Feldman 2018).

O sistema de secreção do tipo III encontrado em bactérias gram-negativas é um aparato composto aproximadamente por 25 proteínas que atuam injetando proteínas de virulência na célula do hospedeiro. Essas proteínas subvertem o funcionamento da célula, comunicações intracelulares, favorecendo a entrada e sobrevivência da célula invasora. Em bactérias fitopatogênicas, o sistema não só contribui para a doença como elicita os mecanismos de defesa da planta relacionados a resistência. O aparato provê um canal contínuo para as proteínas efectoras entre o citoplasma bacteriano e o citoplasma da célula eucariótica (Cornelis e Van Gijsegem 2000, Büttner e He 2009).

Os efetores podem atuar de diversas maneiras, como: inibidores do mecanismo de morte celular programada, suprimindo-o, estimulando a rota de síntese de ácido jasmônico e negativamente regulando as defesas induzidas por ácido salicílico, pois são rotas antagônicas; suprimindo respostas de defesa relacionadas a parede celular e formação de papilas; modulando a transcrição do hospedeiro e suprimindo a ativação de proteínas de resistência (Beth Mudgett 2005, Kay et al. 2007).

Vários trabalhos demonstram a relação entre o repertório de efetores com a capacidade de causar doenças em hospedeiros. Hersemann et al. (2017) sugeriu que a patogenicidade de *X. translucens* pv. *graminis* acontece devido a uma combinação de fatores, incluindo proteínas

efetoras específicas da patovar e alterações em sistemas do tipo IVP e SST3 impedem o reconhecimento por parte da célula e consequentes respostas de defesa, permitindo a colonização de *Lolium multiflorum*. O estudo revelou por MLSA a existência de três linhagens de bactérias causadoras de cretamento bacteriano comum. Ruh et al. (2017) sugeriu que genes de efetores TAL são associados a adaptação de duas espécies filogeneticamente distantes *X. citri* pv. *fuscans* e *X. phaseoli* pv. *phaseoli* a feijão comum e verificou eventos de recombinação e THG contribuindo para a adaptação a hospedeiros.

Hajri et al. (2009) identificaram genes *core* para a espécie *X. axonopodis* e infere a sua herança a partir de um ancestral da espécie, antes das patovares se diversificarem e a especialização a hospedeiro acontecer e também infere sobre a relação entre o repertório de proteínas efetoras do tipo III determinando a gama de hospedeiros. A perda de genes efetores pode levar a expansão da gama de hospedeiros como demonstrado por Schwartz et al. (2015), no qual a deleção de XopQ no isolado Xe85-10 ocasionou o desenvolvimento de sintomas em *Nicotiana benthamina*, sendo que esta estirpe em condições naturais não é patogênica a esta cultura. O mesmo trabalho inferiu a respeito da virulência de *X. perforans* a pimentão, normalmente restrita a tomate devido à ausência do efector AvrBsT. Além disso, AvrBsT está relacionado com o aumento do *fitness* da espécie em campo de tomate (Abrahamian et al. 2018).

Cho et al. (2019) sequenciaram 25 isolados de *R. solanacearum* que pertenciam a quatro patótipos capazes de infectar tomate, batata, berinjela e pimentão. A análise de pan-genoma e efetores indicou a presença de efetores como possíveis determinantes de especificidade a hospedeiro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção da coleção

A coleção com 26 isolados associados com a mancha angular da teca foi obtida com representantes de duas regiões. Da primeira, as coletas foram realizadas em um viveiro localizado em Rosário Oeste - Mato Grosso, com capacidade para 400.000 mudas, nos anos 2016, 2017 e 2018. Da segunda região, dois isolados foram obtidos de mudas provenientes de viveiro do Estado de São Paulo em 2019. Folhas de mudas de teca apresentando pequenas manchas necróticas circundadas por um halo clorótico foram selecionadas para isolamento. Realizou-se o isolamento cortando-se tecido lesionado e tecido sadio e submetendo à desinfestação em álcool 50% por 30 segundos, hipoclorito de sódio 2% por 1 minuto e 3 minutos em água destilada autoclavada. Os isolados (Tabela 1) foram preservados em água filtrada e autoclavada. Além dos isolados de teca, foram utilizados *Xanthomonas citri* de feijoeiro, BRM 48911, BRM 48898 e IBSBF 1346, cedidos pela Dra. Adriane Wendland Ferreira da Embrapa Arroz e Feijão.

Tabela 1. Lista dos 26 isolados de *Xanthomonas* de Mato Grosso e São Paulo que compuseram a coleção de estudo

Isolado	Origem	Isolado	Origem
UnB-Xtec1A	Rosário Oeste-Mato Grosso	UnB-Xtec6C	Rosário Oeste-Mato Grosso
UnB-Xtec1B	Rosário Oeste-Mato Grosso	UnB-Xtec8A	Rosário Oeste-Mato Grosso
UnB-Xtec1C	Rosário Oeste-Mato Grosso	UnB-Xtec9A	Rosário Oeste-Mato Grosso
UnB-Xtec2A	Rosário Oeste-Mato Grosso	UnB-Xtec9C	Rosário Oeste-Mato Grosso
UnB-Xtec2B	Rosário Oeste-Mato Grosso	UnB-Xtec9D	Rosário Oeste-Mato Grosso
UnB-Xtec2C	Rosário Oeste-Mato Grosso	UnB-XtecTg01(1)	Rosário Oeste-Mato Grosso
UnB-Xtec2D	Rosário Oeste-Mato Grosso	UnB-XtecTg02(1)	Rosário Oeste-Mato Grosso
UnB-Xtec4A	Rosário Oeste-Mato Grosso	UnB-XtecTg03(1)	Rosário Oeste-Mato Grosso
UnB-Xtec4B	Rosário Oeste-Mato Grosso	UnB-XtecTg01(2)	Rosário Oeste-Mato Grosso
UnB-Xtec4C	Rosário Oeste-Mato Grosso	UnB-Xtectg02 (2)	Rosário Oeste-Mato Grosso
UnB-Xtec5A	Rosário Oeste-Mato Grosso	UnB-XtecTg03(2)	Rosário Oeste-Mato Grosso
UnB-Xtec6A	Rosário Oeste-Mato Grosso	UnB-XtecFFT1	Garça-São Paulo
UnB-Xtec6B	Rosário Oeste-Mato Grosso	UnB-XtecFFT2	Garça-São Paulo

Teste de patogenicidade

Os isolados foram cultivados em meio NA por 48 h em estufa a 28 °C e colônias típicas foram repicadas para outras placas com meio NA após esse período. Uma suspensão bacteriana de 1×10^9 UFC/mL foi preparada com água destilada e autoclavada. Mudanças de teca de origem seminal com quatro folhas foram utilizadas no teste de patogenicidade. Para o processo de inoculação, um suporte com agulhas foi utilizado para perfurar as folhas de teca. Após as perfurações, algodão embebido na suspensão bacteriana foi pressionado na região perfurada em ambas as faces foliares. Como controle negativo, plantas de teca tiveram perfurações nas folhas e no algodão foi utilizada água destilada e autoclavada. As plantas foram mantidas em câmara úmida por duas semanas para então serem avaliados os sintomas nas folhas inoculadas.

Identificação do gênero *Xanthomonas* por PCR

Para confirmação do gênero das bactérias estudadas, foi utilizada a técnica de PCR, com os primers X-gumD F7 e X-gumD R7 (Adriko et al. 2014) tendo como alvo a região interna do gene *gumD*, componente do *operon* responsável pela biossíntese da goma xantana (*gumB-gumM*) (Katzen et al. 1998). Os isolados bacterianos foram cultivados em meio Nutriente Ágar (NA) a 28 °C por 72 horas e após repicagem e crescimento, uma colônia foi selecionada para servir como *template* para a reação. A PCR foi realizada utilizando-se 0,3 µL do primer X-gumD F7/R7 a 10 µM, 0,5 µL de cada dNTP: dATP, dCTP, dGTP e dTTP, 1,25 µL de tampão de reação, 0,5 µL de MgCl₂, 0,2 U de *Taq* polimerase (Thermo Fischer, Estados Unidos da América) e como *template* utilizou uma colônia e a reação completada com água ultrapura para volume final de 12,5 µL. As amplificações foram conduzidas em um termociclador Bio-Rad T100™ (Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos da América). O aparelho foi programado para uma desnaturação inicial de 4 min a 95 °C, seguido por 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C,

30 s a 58 °C e 1 min a 72 °C com um passo de elongação final de 6 min a 72 °C. O produto da reação foi submetido a eletroforese a 100V em gel de agarose a 1 % em tampão de corrida TAE e o gel corado por imersão em brometo de etídio (10 mg/mL), visualizado sob luz UV com transiluminador Loccus (São Paulo, Brasil).

Extração de DNA

Os isolados foram cultivados em meio Nutriente Ágar (NA) a 28 °C em uma estufa por 72 horas, colônias típicas foram repicadas para novas placas e cultivadas em novas placas de Petri com meio NA com as mesmas condições. Após esse período, as bactérias foram retiradas da placa com uma alça bacteriológica e transferidas para microtubos de 1,5 mL com 1,3 mL de água ultrapura. Os microtubos contendo bactéria foram vortexados, centrifugados a 13.200 rpm por seis minutos e o sobrenadante foi retirado. Foi adicionado 1,3 mL de água ultrapura e o *pellet* bacteriano ressuspensão com um vortex. O procedimento de lavagem foi efetuado três vezes para remoção de exopolissacarídeos ou outros compostos solúveis em água que poderiam prejudicar a extração de DNA ou o produto final. Para o procedimento de BOX-PCR, o DNA dos isolados foi extraído usando o protocolo CTAB com modificações de Boiteux et al. (1999), posteriormente quantificado com o aparelho Nanodrop (Thermo Fisher, Estados Unidos da América) e a concentração ajustada para 50 ng/μL. Para sequenciamento utilizou-se o kit de extração Quick-gDNA MiniPrep (Zymo Research, Estados Unidos da América), seguindo as instruções do fabricante e com a quantificação realizada no aparelho Nanovue (Biochrom, Estados Unidos da América).

BOX-PCR e seleção de haplótipos

A PCR utilizando o *primer* BOX-A1R (Versalovic et al. 1994), foi conduzida para gerar o *fingerprint* dos isolados e permitir identificar a diversidade genética dos mesmos para seleção de haplótipos. Como referência para a PCR foram usados os isolados originários de feijão: BRM 48898 (*X. citri* pv. *fuscans*) e IBSBF 1346 (*X. citri* pv. *fuscans*). Um controle negativo sem DNA foi adicionado. A reação com os isolados de Mato Grosso continha 2,4 µL do primer BOX a 10 µM, 0,96 µL de cada dNTP: dATP, A dCTP, dGTP e dTTP, 1,2 µL de tampão de reação, 0,36 µL de MgCl₂, 0,2 U de *Taq* polimerase (Thermo Fischer, Estados Unidos da América), 1 µL DNA e a reação completada com água ultrapura para volume final de 12,5 µL. A reação com os isolados de Mato Grosso e São Paulo foi conduzida de acordo com o protocolo do kit master mix GoTaq RT qPCR (Promega, Wisconsin, Estados Unidos da América), com 2 µL de DNA. A última reação foi conduzida devido ao fato de que os isolados de São Paulo foram obtidos posteriormente. A reação foi feita em um termociclador Bio-Rad T100™. O equipamento foi programado para uma desnaturação inicial de 7 min a 95 °C, seguido por 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 53 °C e 8 min a 65 °C com um passo de alongação final de 15 min a 65 °C. Para visualização, a eletroforese foi realizada em gel de agarose (1,5 %) com tampão TBE e corado por imersão em brometo de etídio (10 mg/mL). O marcador utilizado foi o 1 Kb DNA *Ladder* (Kasvi, Paraná, Brasil) e a visualização do gel de eletroforese com o transiluminador Locus (São Paulo, Brasil).

Haplótipos entre os isolados originários de teca foram, pela análise visual do padrão de fragmentos amplificados encontrados nos géis.

Sequenciamento genômico

Dois isolados apresentando o mesmo haplótipo foram selecionados por BOX-PCR, UnB-Xtec2D e UnB-XtecTg02(2), tiveram seus genomas sequenciados. O genoma do isolado UnB-Xtec2D foi sequenciado usando a abordagem híbrida (*long read/short read*), primeiramente sequenciado com o sistema MinION (Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido), com *flow cell* modelo FLO-MIN106, seguindo o protocolo do kit de sequenciamento genômico SQK-RAD004 por 30 minutos. Após a aquisição dos *long reads* gerados pelo MinION, o genoma do isolado UnB-Xtec2D foi enviado para sequenciamento em Illumina Hiseq 4000 na empresa Beijing Genome Institute (BGI, Co.Ltd, Hong Kong) com biblioteca preparada com kit próprio da empresa. O isolado UnB-XtecTg02(2) foi sequenciado somente na plataforma Illumina Hiseq 4000 utilizando as mesmas condições descritas anteriormente.

Montagem do genoma

Os sinais originários do sequenciamento do isolado UnB-Xtec2D pela plataforma MinION foram convertidos para nucleotídeos com o *basecaller* Guppy (Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido) e os *reads* foram montados no *software* Canu (Koren et al. 2017) com correção no Nanopolish (Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido) para posterior montagem híbrida. A qualidade dos *reads* gerados no sequenciamento Illumina foram avaliados com o software FastQC (Andrews 2010). Os adaptadores foram removidos pela empresa antes do envio das sequências. A montagem do isolado UnB-Xtec2D foi realizada no programa Unicycler (Wick et al. 2017b) utilizando-se o genoma montado pelo Canu/Nanopolish e os *reads* provenientes do sistema MiniION e Illumina. O isolado UnB-XtecTg02(2) foi inicialmente montado no Unicycler com posterior correção no Geneious Prime 2020 (Kearse et al. 2012) usando os *reads* do sequenciamento. Os genomas montados foram submetidos ao

Genbank para anotação via *Prokaryotic Genome Annotation Pipeline* (PGAP) (Tatusova et al. 2016) e depósito das sequências na base de dados.

Multilocus sequence analysis (MLSA)

Para a filogenia por *multilocus sequence analysis* (MLSA), foram obtidos do Genbank 102 genomas/isolados do gênero *Xanthomonas* (Tabela 2). A partir das anotações originais, extraiu-se os genes *housekeeping gyrB* (DNA gyrase subunit B), *rpoD* (RNA polymerase sigma factor 70), *atpD* (ATP synthase- beta chain), *dnaK* (70-kDa heat shock protein), *efp* (elongation factor P), *fyuA*: proteína transmembrana (Ton-B dependent transporter) e *glnA* (glutamine synthetase I) para a realização da análise (Ferreira et al. 2019). As sequências dos genes *housekeeping* foram alinhadas e concatenadas no software Geneious Prime 2020 (Kearse et al. 2012) com o *plugin* do algoritmo de alinhamento Clustal Omega (Sievers et al. 2011). O método de inferência Bayesiana (IB) foi utilizado para a construção da árvore filogenética, conduzida no MrBayes (Huelsenbeck e Ronquist 2001) com o *plugin* do servidor CIPRES (Miller et al. 2010) dentro do programa Geneious Prime 2020 com 4 milhões de gerações e modelo GTR+I+G. Modelo previamente selecionado no MrModeltest (Nylander 2002) baseando-se no Critério de Informação Akaike (AIC). Como *outgroup* foi selecionado uma espécie mais distante, *Xanthomonas albilineans*.

Uma segunda árvore foi construída contendo isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalyptorum*. Realizou-se o alinhamento e concatenamento de quatro genes (*dnaK*, *fyuA*, *gyrB* e *rpoD*) para os isolados da árvore anterior adicionando-se os isolados LPF 564, LPF 582, LPF 590 e LPF 600. A escolha foi baseada no fato de cada isolado estar em um subclado diferente na análise filogenética (Ferraz et al. 2018). A filogenia por inferência bayesiana foi construída

no MrBayes com modelo GTR+G+I previamente selecionado no MrModeltest via servidor CIPRES em um *plugin* do Geneious Prime 2020 com 2 milhões de gerações.

Tabela 2. Espécies, isolados e acessos de *Xanthomonas* extraídas do GenBank para as análises filogenéticas

Espécie	Isolado	Acesso
<i>Xanthomonas albilineans</i>	GPE PC73	NC_013722.1
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	Xaj 417	NZ_CP012251.1
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	Xac29-1	NC_020800.1
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>commiphoreae</i>	LMG26789	NZ_CP031059.1
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>melhusii</i>	LMG9050	NZ_LOJW00000000.1
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	CFBP412	CP020964.1
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	CFBP6982	CP020975.1
<i>Xanthomonas bromi</i>	CFBP1976	NZ_MDCE00000000.1
<i>Xanthomonas bromi</i>	LMG947	NZ_FLTX00000000.1
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	ATCC 33913	AE008922.1
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	ICMP 4013	NZ_CP012146.1
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	85-10	NZ_CP017190.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>aurantifolii</i>	FDC 1609	NZ_CP011163.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>aurantifolii</i>	1566	NZ_CP012002.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	FB19	NZ_CP009022.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	GD2	NZ_CP009019.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	JX4	NZ_CP009013.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	JX5	NZ_CP009010.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	jx-6	NZ_CP011827.2
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	LH201	NZ_CP018858.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	LH276	NZ_CP018854.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	LJ207-7	NZ_CP018850.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	LL074-4	NZ_CP018847.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	MN10	NZ_CP009004.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	MN11	NZ_CP009001.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	MN12	NZ_CP008998.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	NT17	NZ_CP008995.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	BL18	NZ_CP009025.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	MF20	NZ_CP009007.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	306	NC_003919.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	5208	NZ_CP009028.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	Xcc29-1	NZ_CP023661.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	Xcc49	NZ_CP023662.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	AW13	NZ_CP009031.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	AW14	NZ_CP009034.1

<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	TX160042	NZ_CP020882.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	TX160197	NZ_CP020889.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	TX160149	NZ_CP020885.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>fuscans</i>	CFBP6990	NZ_OCYU00000000.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>fuscans</i>	CFBP6992	NZ_OCYZ00000000.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>fuscans</i>	ISO12C3	NZ_CP012055.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>fuscans</i>	ISO118C1	NZ_CP012053.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>fuscans</i>	ISO118C5	NZ_CP012051.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>fuscans</i>	CFBP6166	NZ_OCYR00000000.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>glycines</i>	str. 8ra	NZ_JDSU00000000.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>glycines</i>	str. 12-2	CP015972.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>malvacearum</i>	MS14003	NZ_CP023159.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>malvacearum</i>	MSCT	CP017020.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>malvacearum</i>	AR81009	NZ_CP023155.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>malvacearum</i>	XcmH1005	NZ_CP013004.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>malvacearum</i>	XcmN1003	NZ_CP013006.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	CFBP6988R	NZ_CP020979.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	CFBP6989	NZ_CP020981.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	CFBP6991	NZ_CP021015.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	CFBP6994R	NZ_CP020987.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	CFBP6996R	NZ_CP020989.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	CFBP6167	NZ_CP021018.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	CFBP4885	NZ_CP020992.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	CFBP6165	NZ_CP020998.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>vignicola</i>	CFBP7111	NZ_CP022263.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>vignicola</i>	CFBP7113	NZ_CP022270.1
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	UI6	NZ_CP008992.1
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	UI7	CP008989.1
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	AW15	CP009037.1
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	AW16	CP009040.1
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	Aw12879	NC_020815.1
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	A306	NZ_CP006857.1
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	gd3	CP009016.1
<i>Xanthomonas codiae</i>	CFBP 4690	NZ_MDEC00000000.1
<i>Xanthomonas cucurbitae</i>	CFBP 2542	NZ_MDED00000000.1
<i>Xanthomonas cynarae</i>	CFBP 4188	NZ_MDFM00000000.1
<i>Xanthomonas dyei</i>	CFBP 7245	NZ_MDEE00000000.1
<i>Xanthomonas dyei</i>	PLY_1	NZ_QREU00000000.1
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	LMG930	NZ_CP018467.1
<i>Xanthomonas floridensis</i>	WHRI 8848	NZ_LXNG00000000.1
<i>Xanthomonas fragariae</i>	Fap21	CP016830.1
<i>Xanthomonas fragariae</i>	Fap29	CP016833.1
<i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i>	FDC 1559	CP011160.1
<i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i>	FDC 1561	CP011250.1

<i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i>	4834-R	FO681494.1
<i>Xanthomonas gardneri</i>	JS749-3	NZ_CP018728.1
<i>Xanthomonas gardneri</i>	ICMP 7383	NZ_CP018731.1
<i>Xanthomonas hortorum</i>	B07-007	NZ_CP016878.1
<i>Xanthomonas hyacinthi</i>	CFBP 1156	NZ_CP043476.1
<i>Xanthomonas melonis</i>	CFBP 4644	NZ_MDEH00000000.1
<i>Xanthomonas nasturtii</i>	WHRI 8984	NZ_QUZM00000000.1
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	ICMP3125	NZ_CP031697.1
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	AUST2013	NZ_CP033196.1
<i>Xanthomonas perforans</i>	91-118	NZ_CP019725.1
<i>Xanthomonas perforans</i>	LH3	NZ_CP018475.1
<i>Xanthomonas pisi</i>	CFBP 4643	NZ_MDEI00000000.1
<i>Xanthomonas pisi</i>	DSM 18956	NZ_JPLE00000000.1
<i>Xanthomonas Populi</i>	CFBP 1817	NZ_MDEJ00000000.1
<i>Xanthomonas prunicola</i>	CFBP8354	NZ_PHKW00000000.1
<i>Xanthomonas prunicola</i>	CFBP8355	NZ_PHKX00000000.1
<i>Xanthomonas theicola</i>	CFBP 4691	NZ_MIGX00000000.1
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>undulosa</i>	ICMP 11055	NZ_CP009750.1
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>undulosa</i>	Xtu 4699	NZ_CP008714.1
<i>Xanthomonas vasicola</i>	NCPFB 902	NZ_CP034657.1
<i>Xanthomonas vasicola</i>	NCPFB 1060	NZ_CP034649.1
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	LM159	NZ_CP018470.1
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	LMG 911	NZ_CP018725.1

Average nucleotide identity (ANI)

Com o propósito de determinar a espécie de *Xanthomonas* que infecta teca, realizou-se a análise de *Average Nucleotide Identity* (ANI) no programa fastANI (Jain et al. 2018) com todos os isolados usados na análise de MLSA. Os dados de *output* da análise foram usados para construir uma matriz de identidade. As sequências usadas para realizar MLSA (*gyrB*, *rpoD*, *atpD*, *dnaK*, *efp*, *fyuA* e *glnA*) foram utilizadas para construir uma matriz de identidade no programa SDT (Muhire et al. 2014) com o algoritmo de alinhamento MAFFT (Katoh et al. 2002).

Filogenômica

Para a análise filogenômica com a abordagem de *single nucleotide polymorphism* (SNP), foi utilizado o software Snippy (Seemann 2015) para gerar o alinhamentos de SNPs dos genomas de *Xanthomonas*, porém, sendo necessária a remoção de regiões putativas recombinantes para evitar a má interpretação das relações filogenéticas. A análise de recombinação foi realizada pelo programa Gubbins (Croucher et al. 2015) utilizando a configuração *default* do programa. A árvore foi construída pelo Gubbins usando o modelo GTR via FastTree.

Análise dos sistemas de secreção

Para detectar a presença e caracterizar os sistemas de secreção nos genomas sequenciados foi utilizado o programa TXSSCAN (Abby et al. 2016) na plataforma de bioinformática Galaxy (Afgan et al. 2018) e com visualização dos dados no MacSyView (Abby et al. 2014).

Identificação de efetores TALE e regiões CRISPR

A fim de identificar a presença de regiões CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) e de efetores do tipo TAL (Transcription Like-Effectors) utilizou-se os genomas montados com o Unicycler no servidor CRISPRfinder online (Grissa et al. 2007) e no software AnnoTALE (Grau et al. 2016), respectivamente. Todos os programas foram usados com as configurações *default*.

Análise de efetores SST3

Entre os genomas mais próximos dos isolados de teca (>99%) de identidade, foram selecionados 21 genomas, visando avaliar o arsenal de efetores associados com a capacidade

de infecção das espécies. Os genomas foram comparados via BLAST local com as sequências de 65 famílias de efetores disponíveis no site Xanthomonas.org. As sequências dos efetores com menos de 60% de cobertura e/ou identidade foram considerados ausentes no genoma em análise. Uma matriz de ausência e presença de efetores foi construída para cada genoma usando-se o Microsoft Excel e a figura construída no Heatmapper (Babicki et al. 2016).

Análise de recombinação

Com o *output* da análise de recombinação gerada pelo programa Gubbins (descrito no item Filogenômica), foi comparada a posição das regiões recombinantes com os efetores detectados nos isolados de teca, visando confirmação de possíveis aquisições de efetores por meio de recombinação. A visualização do resultado foi feita na plataforma web Phandango (Hadfield et al. 2018).

Gama de hospedeiros

Com base no resultado de ANI, foram selecionados os hospedeiros dos isolados que apresentaram maior identidade de sequências com os originalmente de teca. Assim, os hospedeiros *Phaseolus vulgaris* cultivar Pérola (mudas com quatro semanas), *Vigna unguiculata* cv. Guariba (mudas com quatro semanas) e *Citrus latifolia* cv. BRS Passos (planta adulta s/ idade determinada) foram selecionados para o teste de gama de hospedeiros. *Eucalyptus urograndis* e *Corymbia citridora* também foram selecionados por serem comuns em viveiros de espécies florestais, podendo ser um espaço compartilhado com teca. O processo de inoculação foi similar ao teste de patogenicidade, havendo quatro plantas por isolado e em cada planta, seis folhas foram inoculadas, perfurando-se quatro a seis pontos da folha de teca. As plantas foram mantidas em câmara úmida por duas semanas e após esse período, transferidas

para um telado da Estação Experimental do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Quatro semanas após a inoculação, duas folhas de *Citrus* e *Tectona*, três folhas de *Eucalyptus*, *Corymbia*, *P. vulgaris* e *V. unguiculata* foram selecionadas, destacadas e digitalizadas para a avaliação de sintomas. Independente de sintomas detectados nas plantas avaliadas, foi feito o isolamento do tecido próximo à lesão e quando detectadas colônias bacterianas, foi realizado Bio-PCR com os *primers* X-gumD F7/R7.

Identificação de genes de insensibilidade ao cobre (*cop*)

O cobre e compostos com esse elemento são amplamente usados no controle de bacterioses, inclusive as causadas por espécies do gênero *Xanthomonas*. Foi verificada a presença de genes associados com a insensibilidade ao cobre nos genomas dos isolados de teca. Sequência completas dos genes *copL*, *copA*, *copB* foram baixadas do GenBank e comparados por BLAST contra os genomas sequenciados dos isolados de teca. A fim de verificar a presença do *operon cop* no restante da coleção de isolados de teca, realizou-se a PCR com os *primers* *copAF/AR* com alvo o gene *copA* desenvolvidos por Behlau et al. (2013) e reação de acordo com o protocolo do kit master mix GoTaq RT qPCR (Promega, Wisconsin, Estados Unidos da América). As condições configuradas no termociclador para essa reação foi: desnaturação inicial de 5 min a 95 °C, seguido por 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 s a 64 °C e 45 s a 72 °C com um passo de alongação final de 10 min a 72 °C.

Dois isolados de *Xanthomonas euvesicatoria* com níveis de sensibilidade já conhecidos foram utilizadas como controle, P-89 (sensível a cobre) e P-120 (insensível), ambos cedidos pela Dra. Alice Maria Quezado Duval da Embrapa Hortaliças.

4. RESULTADOS

Coleção de isolados

Folhas de mudas de teca apresentando sintomas de pequenas manchas necróticas circundadas por um halo clorótico e/ou apresentando manchas amarelas podendo ou não haver necrose, foram selecionadas para isolamento. (Figura 1). Colônias mucóides de coloração amarelada foram obtidas a partir dos isolamentos (Figura 2).

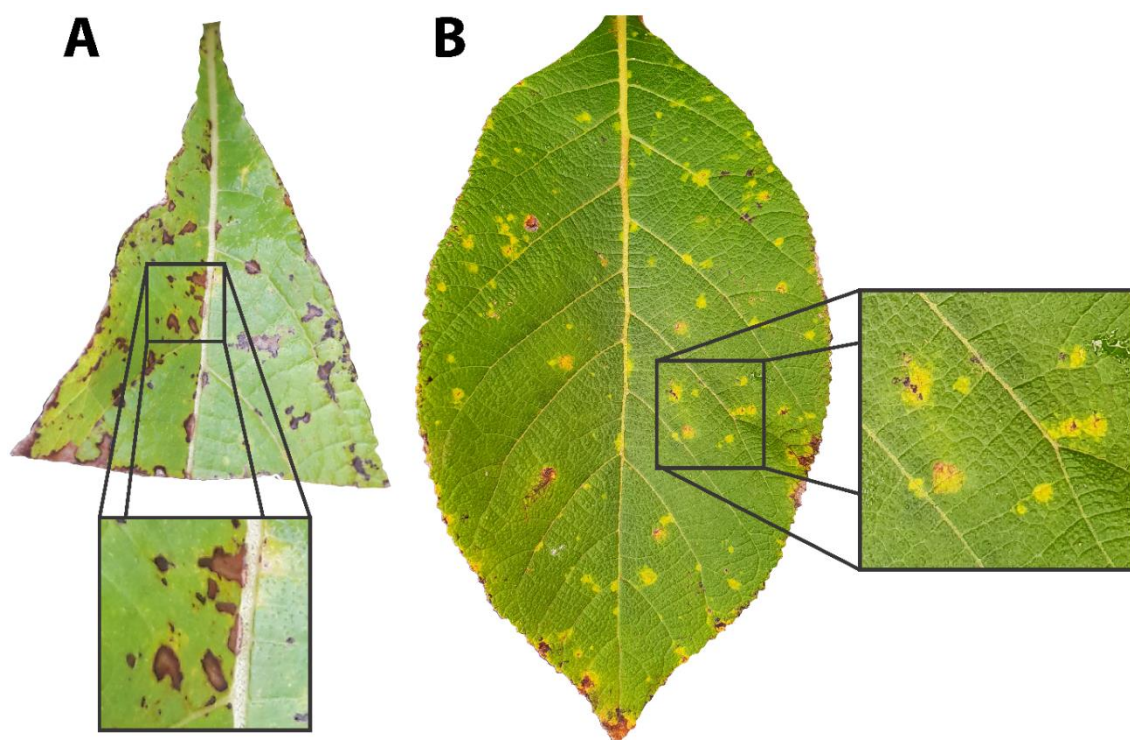


Figura 1. Folhas sintomáticas de *Tectona grandis* (teca) apresentando manchas foliares. A: viveiro de Mato Grosso (2016, 2017 e 2018). B: viveiro de São Paulo (2020).

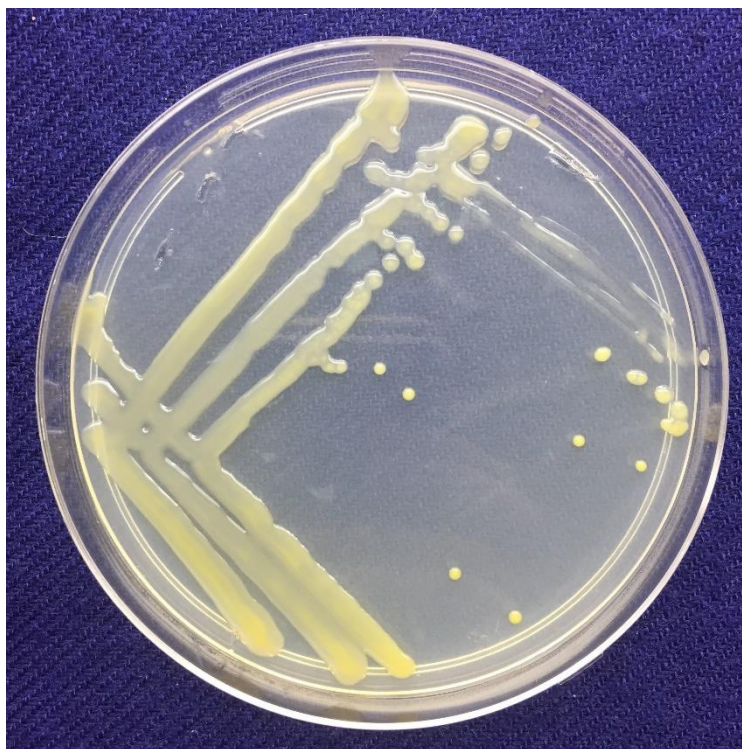


Figura 2. Colônias isoladas a partir de folhas sintomáticas de *Tectona grandis* (teca) cultivadas em meio NA a 28° C por 72h.

Patogenicidade

Os isolados UnB-Xtec2D, UnB-XtecTg02(2) e UnB-XtecFFT1 foram inoculados em mudas de teca para confirmação de patogenicidade. O isolado UnB-Xtec2D não induziu sintomas em teca. O isolado UnB-XtecTg02(2) foi capaz de causar sintomas nas mudas, entretanto, proporcionou sintomas leves quando comparados àqueles dos viveiros. O UnB-XtecFFT1, isolado mais recente, causou sintomas típicos, com pequenas manchas necróticas e manchas amarelas próximo ao ponto de inoculação. O isolamento confirmou a presença dos isolados UnB-XtecTg02(2) e UnB-XtecFFT1 nos tecidos da planta. Com esses resultados foram selecionados somente os isolados UnB-XtecTg02(2) e UnB-XtecFFT1 para o teste de gama de hospedeiras.

Identificação do gênero por PCR

Os 24 isolados de teca de Mato Grosso e os três isolados originários de feijoeiro amplificaram um fragmento de 402 pb, correspondente a sequência parcial do gene *gumD*, típico em bactérias do gênero *Xanthomonas* (Figura 3). A amplificação confirma o gênero dos isolados da coleção. O mesmo procedimento foi realizado com os dois isolados de São Paulo (UnB-XtecFFT) e a amplificação do fragmento de 402 pb foi confirmada (dado não apresentado).

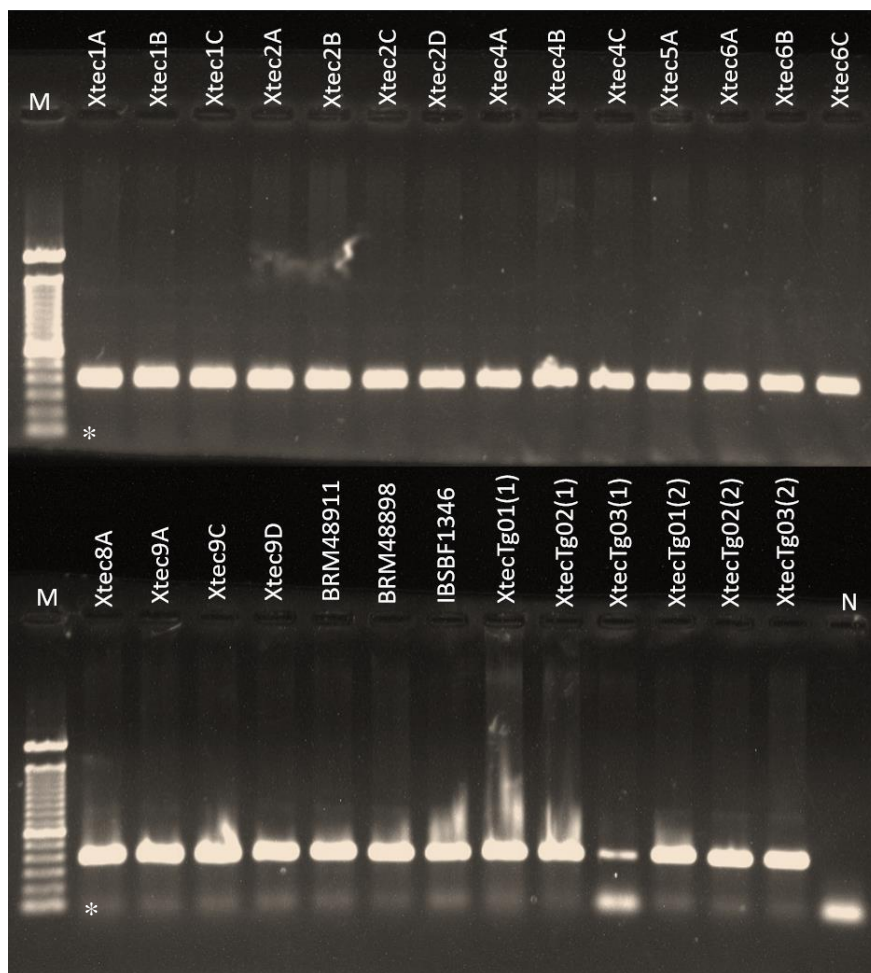


Figura 3. Produtos da PCR com os *primers* X-gumD F7/R7 visando detecção do gene *gumD*, típico de espécies de *Xanthomonas*, na coleção de isolados de teca. M: marcador DNA ladder 1 Kb plus Invitrogen. N: controle negativo. *: 100 pb.

Análise da diversidade de isolados de *Xanthomonas* por BOX-PCR

A partir dos fragmentos amplificados pelo BOX-PCR para verificar a diversidade, somente foi possível identificar três haplótipos entre os isolados avaliados (Figuras 4 e 5). Os 25 isolados de teca foram similares, tanto originários de plantas de Mato Grosso como de São Paulo, demonstrando não haver diversidade entre eles, portanto, considerados clonais e configurando um único haplótipo. Entretanto, observa-se que quando comparados com os isolados de feijão (também *X. citri*), há diferença, BRM 48911 e BRM 48898 (*X. citri* pv. *fuscans*) apresentam um padrão diferente da coleção de isolados de teca (haplótipo 2), diferenciando-se do grupo de isolados de teca pela presença de bandas exclusivas e ausência de bandas presentes em isolados de teca, formando um segundo grupo entre os isolados analisados. IBSBF 1346 (*X. citri* pv. *fuscans*) possui *fingerprint* diferente dos demais caracterizando o haplótipo 3 desta análise.

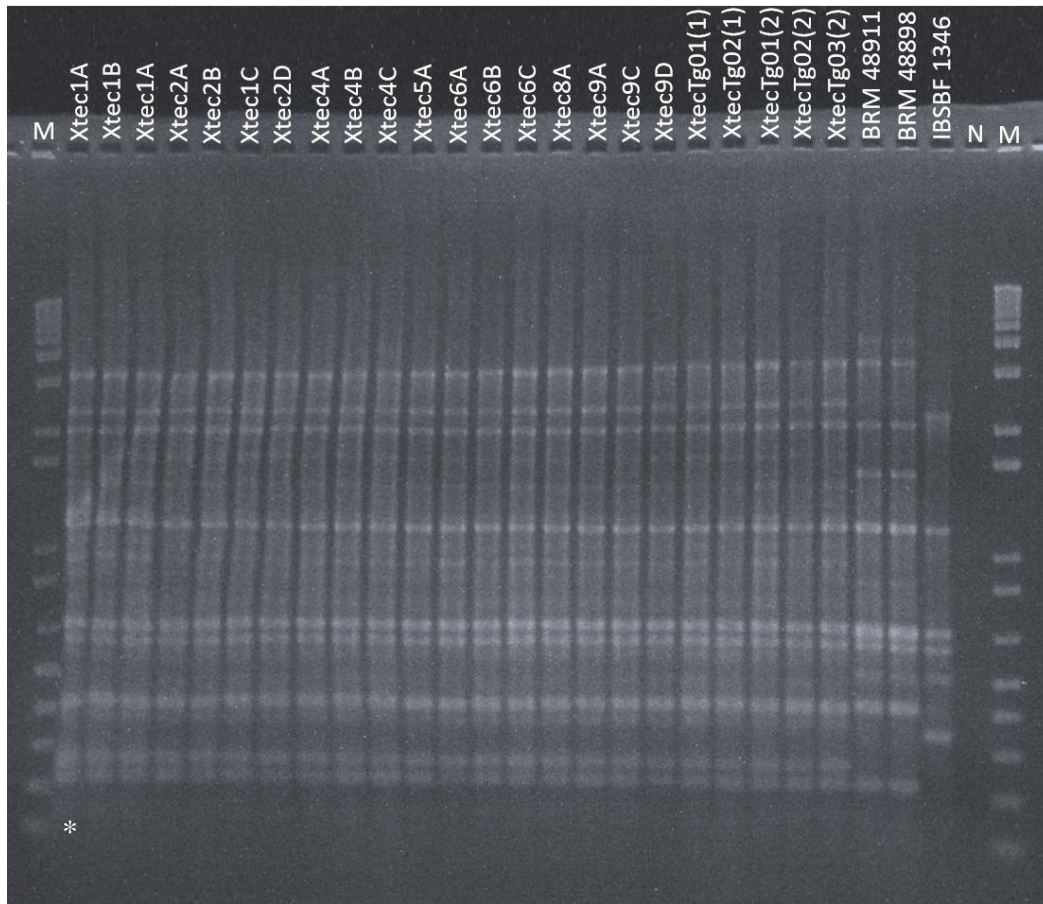


Figura 4. Perfis de BOX-PCR com o *primer* BOX-A1R dos isolados de *Xanthomonas* originários de Mato Grosso e *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* (BRM 48911, BRM 48898 e IBSBF 1346). M: marcador DNA ladder 1 Kb Plus Invitrogen. N: controle negativo. *: 100 pb.

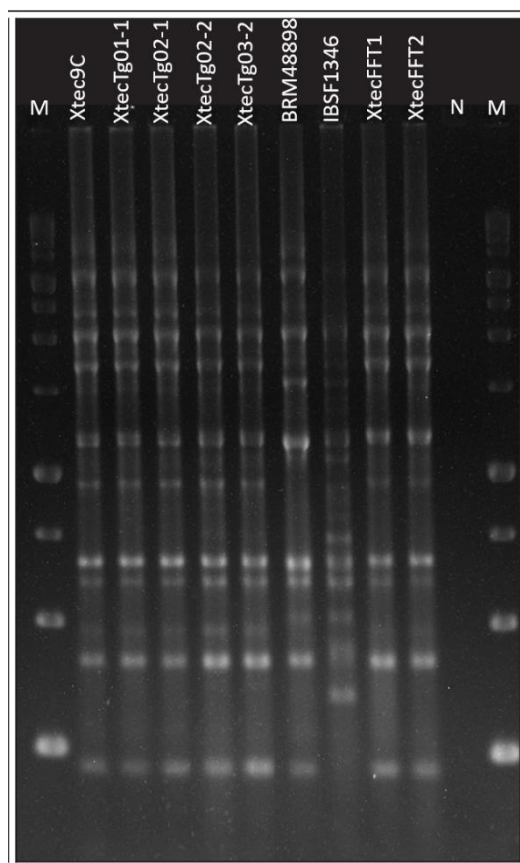


Figura 5. Perfis de BOX-PCR com o primer BOX-A1R dos isolados de *Xanthomonas* originários de Mato Grosso e São Paulo e *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* (BRM 48898 e IBSBF 1346). M: marcador DNA ladder 1 Kb Kasvi. N: controle negativo.

Sequenciamento dos genomas e características

Com o BOX-PCR indicando um único haplótipo entre os isolados de teca, os isolados UnB-Xtec2D e UnB-XtecTg02(2) foram selecionados para o sequenciamento, estudos taxonômicos, genômicos, filogenéticos e patogênicos. Dois isolados foram sequenciados a fim de obter maiores informações sobre o genoma e possíveis variações que não puderam ser detectadas com o uso de marcador. O isolado UnB-XtecFFT1, utilizado em análises de BOX-PCR, patogenicidade e gama de hospedeiro, foi adquirido posteriormente ao sequenciamento dos isolados UnB-Xtec2D e UnB-XtecTg02(2) e será sequenciado futuramente.

O sequenciamento de ambos indicou um único cromossomo circular sem a presença de plasmídeos ou outros *replicons*. O genoma do isolado UnB-Xtec2D possui 5.153.268 pb e 4.071 genes, enquanto o isolado UnB-XtecTg02(2) possui 5.153.348 pb e 4.252 genes, ambos com 64,6 % de conteúdo GC (Tabela 3).

Tabela 3. Características gerais dos genomas de *Xanthomonas citri* pv. *tectonae*

Características	UnB-Xtec2D	UnB-XtecTg02(2)
Comprimento (pb)	5.153,268	5.153,348
Conteúdo G+C (%)	64,6	64,6
CDS	4.271	4.252
RNA _t	53	53
RNA _r	6	6
Plasmídeo	0	0
CRISPR	0	0
TALE	0	0

Identificação de efetores TALE e regiões CRISPR

A busca realizada pelo AnnoTALE não foi capaz de localizar nenhum gene efetor do tipo TAL ou TALE, assim como o CRISPRFinder não localizou regiões CRISPR nos genomas dos isolados de teca (Tabela 3).

Multilocus Sequence Analysis (MLSA)

A confirmação do gênero e identificação da espécie realizada pela análise de *multilocus* de sete genes *housekeeping* foi conduzida com 102 genomas do gênero *Xanthomonas* (Tabela 2). A sequência concatenada utilizada na análise resultou em um tamanho de 12.156 pb, sendo 1.407 pb (*atpD*), 1.926 pb (*dnaK*), 567 bp (*efp*), 2.457 pb (*fuyA*), 1.410 (*glnA*), 2.445 para *gyrB*, com exceção para *X. axonopodis* pv. *melhusii* no qual obteve-se apenas 1.148 pb e 1.878 pb (*rpoD*). A árvore filogenética, com elevados valores de probabilidade posterior, revelou a formação de dois clados de *X. citri* (Figura 6). O 1 é composto por 40 isolados obtidos a partir dos hospedeiros: *Citrus* spp., havendo *C. sinensis*, *C. paradisi*, *C. aurantifolia*, *C. hystrix*, *C.*

limon, *Gossypium* spp., *Glycine max* e *T. grandis*. Houve a formação de 5 subgrupos, separados principalmente por hospedeiro com dois subgrupos separados a partir do gênero *Citrus*, outro proveniente de *Gossypium*, um subgrupo com *X. axonopodis* pv. *melhusii* sozinha e um último subgrupo com isolados de *Glycine* spp. O clado 2 abrange 25 isolados obtidos de *Phaseolus* spp., *Vigna* spp., *Tectona grandis* e *Citrus* spp. distribuídos em 6 subgrupos. O subgrupo 1 do clado 2 é composto por espécies isoladas a partir de *Phaseolus* spp. O subgrupo 2 com bactérias isoladas a partir de *Vigna* spp. e o subgrupo 3 contendo espécies de *Phaseolus* spp. O subgrupo 4 composto apenas pelos isolados de teca obtidos neste estudo. Subgrupo 5 composto por isolados de *Phaseolus* spp. e o subgrupo 6 com isolados de *Citrus*: FDC 1559 (*C. aurantifolia*), FDC 1609 (*C. paradisi*), 1566 (*C. aurantifolia*) e FDC 1561 (*C. limon*). De acordo com a filogenia dos genes *housekeeping*, as bactérias isoladas a partir de teca foram agrupadas juntamente com *X. citri* provenientes de *Phaseolus* spp., *Vigna* spp. e espécies de *Citrus* spp. e as bactérias filogeneticamente mais próximas foram as causadoras do crestamento bacteriano comum em feijão. A análise filogenética demonstrou que *X. axonopodis* pv. *melhusii* que possui *T. grandis* como hospedeira, não é filogeneticamente próxima (clado I) dos isolados da mesma hospedeira encontrados no Brasil, como UnB-Xtec2D e UnB-XtecTg02(2) (clado II).

Diante do relato de Ferraz et al. (2018) da patovar *eucalyptorum* de *X. axonopodis* do *Eucalyptus* spp. ser filogeneticamente próxima à *X. citri*, foi avaliada a possibilidade de isolados de teca serem idênticos ou próximos à essa variante. A análise filogenética incluindo isolados de *X. axonopodis* pv. *eucalyptorum* confirmou que são de um clado distante de isolados de teca (Figura 7).

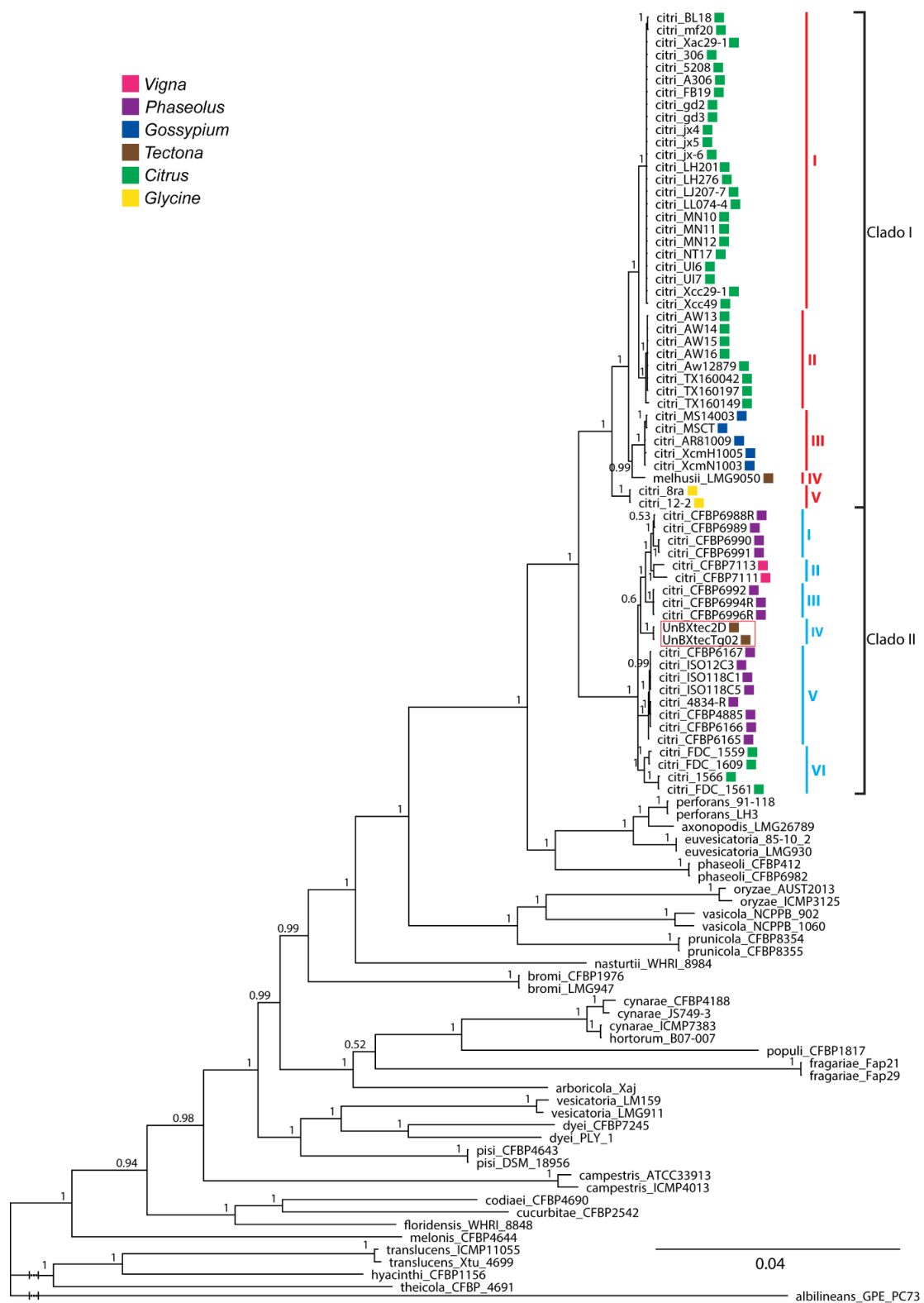


Figura 6. Árvore filogenética por inferência Bayesiana, modelo GTR+G+I com sequências concatenadas de sete genes housekeeping (*atpD*, *dnaK*, *efp*, *fyuA*, *glnA*, *gyrB* e *rpoD*) de isolados de teca e demais espécies de *Xanthomonas* e *Xanthomonas albilineans* GPE PC73 como *outgroup*. Retângulo vermelho: isolados de teca deste estudo.

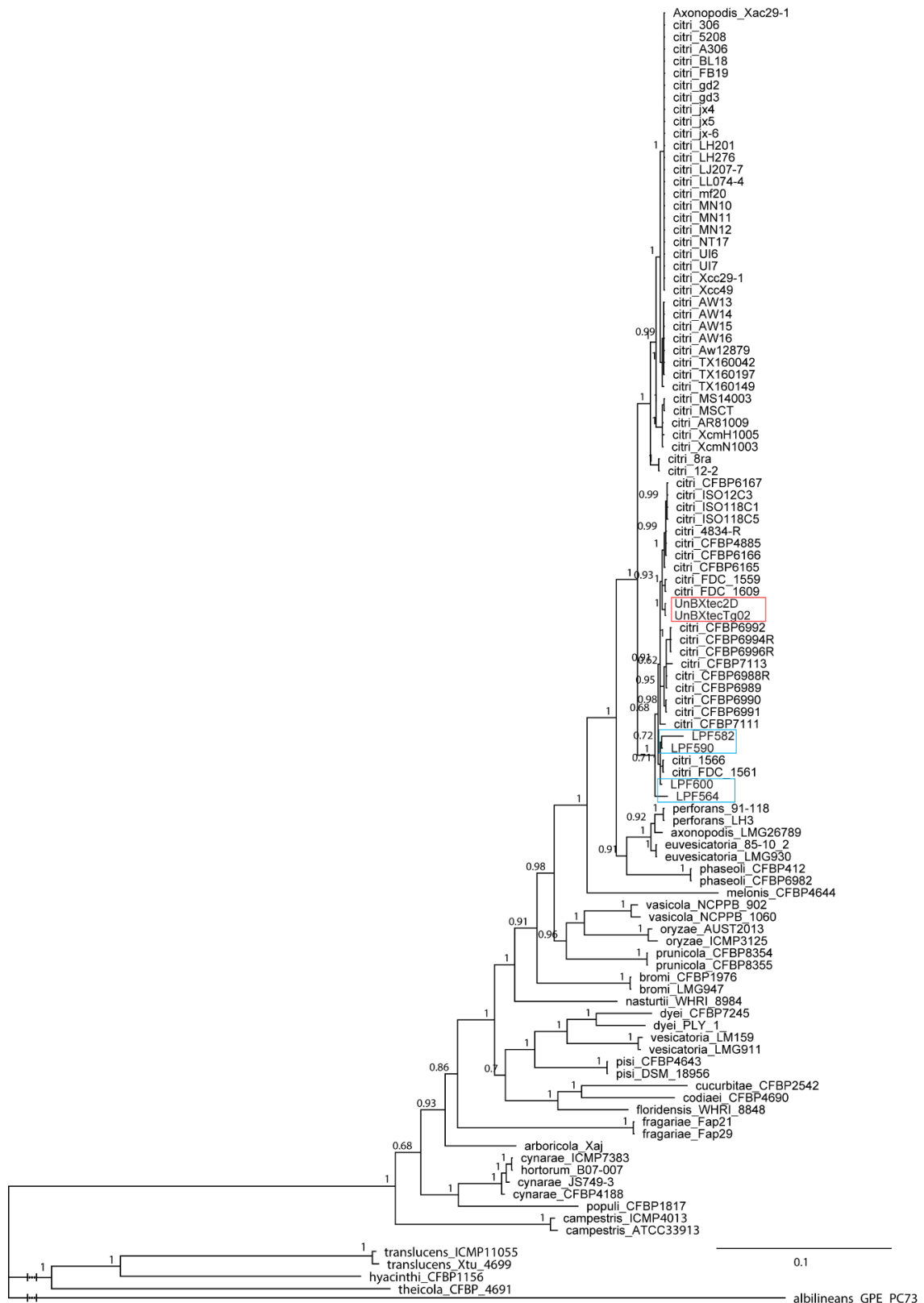


Figura 7. Árvore filogenética por inferência Bayesiana, modelo GTR+G+I, com quatro genes housekeeping (*dnaK*, *fyuA*, *gyrB* e *rpoD*) de espécies de *Xanthomonas* e *Xanthomonas*

albilineans GPE PC73 como *outgroup*. Retângulo azul: isolados de *X. axonopodis* pv. *eucalyptorum*. Retângulo vermelho: isolados de teca deste estudo.

Comparação dos genomas por Average Nucleotide Identity (ANI)

Outra abordagem utilizada na identificação da etiologia da doença de teca por ANI. Para isso, 102 genomas do gênero *Xanthomonas* foram utilizados para a comparação e os valores de ANI foram calculados. Após a análise fez-se uma matriz de identidade menor contendo apenas os isolados da mesma espécie da bactéria isolada a partir de *T. grandis*.

O resultado da análise de ANI confirmou que os isolados provenientes de teca devem ser classificados como *X. citri*, com valores de identidade superiores a 95% (Figura 8), valor determinante para a delimitação de espécies (Goris et al. 2007). Dentro da espécie *X. citri* foram encontrados valores maiores do que 95%, variando de 96% a 99%. Os valores de ANI encontrados são próximos aos valores de identidade com sete genes *housekeeping*.

O valor de ANI entre os clados I e II foi de 96%, sugerindo pertencerem à mesma espécie apesar de estarem em clados separados na filogenia. Quanto ao clado I, os valores de ANI do subgrupo I em relação ao II, ambos possuindo *Citrus* spp. como hospedeiro foram 100%, mas quando se compara o subgrupo I com o subgrupo III composto por bactérias provenientes de *Gossypium* spp. os valores variam entre 98% e 99%. Quando se compara o subgrupo I de *Citrus* spp. com bactérias isoladas de *Glycine* spp. (subgrupo V) foi visto 99% no ANI. O ANI entre os isolados de *Glycine* spp. e *Gossypium* spp. é de 98%. Os resultados mostram valores de ANI abaixo de 100% quando se compara isolados de diferentes hospedeiros.

Quanto ao clado II, o subgrupo I comparado com os subgrupos III e V, todos isolados a partir de *Phaseolus* spp. possuem 99% no ANI. A comparação do subgrupo I com o subgrupo IV contendo isolado de *T. grandis* e subgrupo VI de *Citrus* spp. resultou em um ANI de 99%. A comparação entre os subgrupos de *Phaseolus* spp. se fixou em 99%, mas o valor de ANI é reduzido para 98% quando a comparação é feita com isolados de *Vigna* spp. Comparando-se

apenas isolados de *Citrus* spp. os valores de ANI variaram entre 99% e 100%. Houve relação entre os resultados de ANI e MLSA na matriz, como já foi demonstrado por Constantin et al. (2016).

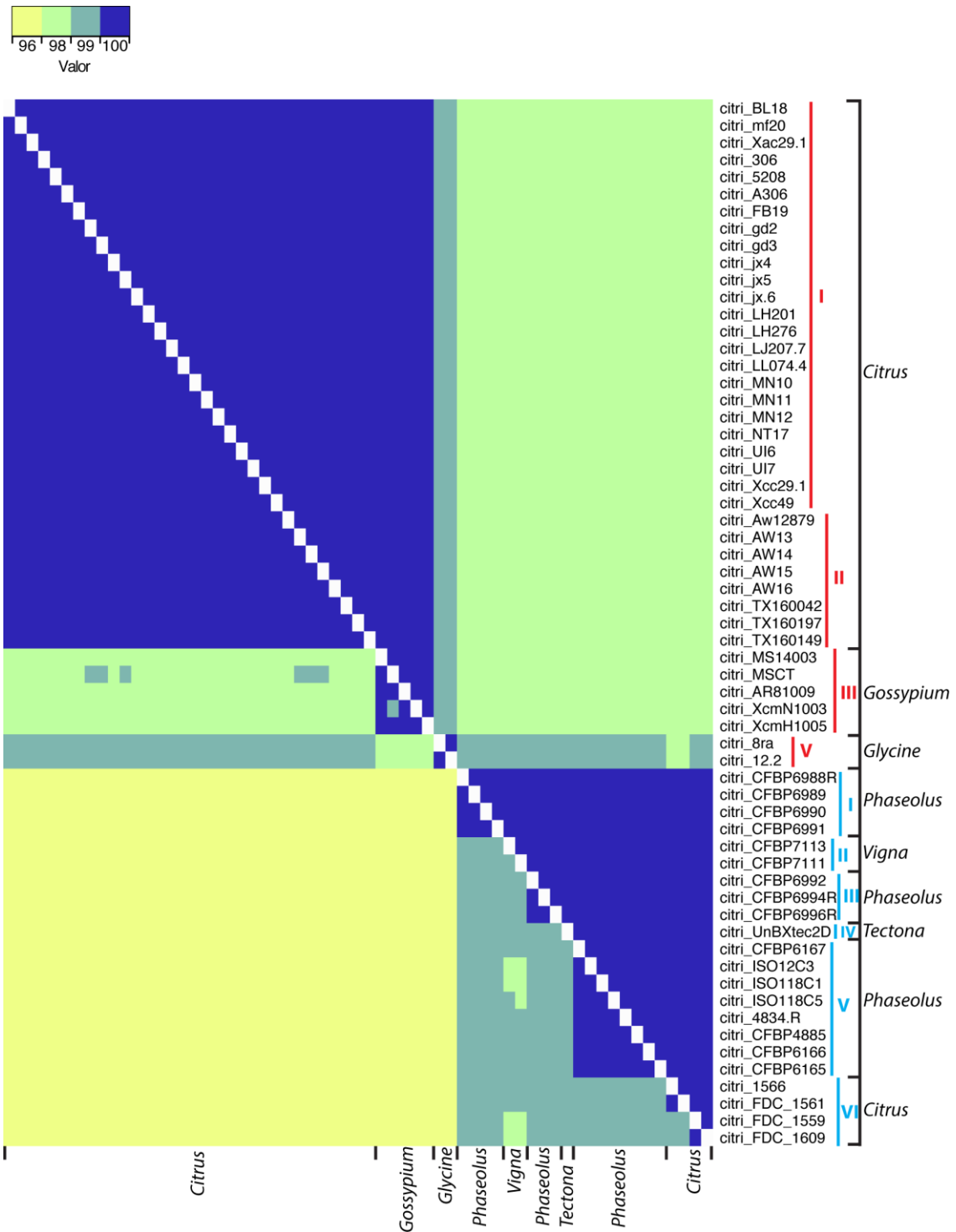


Figura 8. Heatmap de *average nucleotide identity* (ANI) no triângulo inferior e MLSA (triângulo superior) de 61 isolados da espécie *Xanthomonas citri*. Os valores de ANI e MLSA são demonstrados pelas cores: amarelo = 96 % ANI, verde = 98 %, azul claro = 99 % e azul marinho = 100% ANI.

Filogenômica

Para confirmar os dados encontrados por MLSA e ANI, os isolados de teca foram analisados também por filogenômica de SNPs. Os isolados de teca se localizaram em um subclado no qual há também *X. citri* provenientes de *Citrus* spp. Assim, de acordo com os marcadores SNP, os isolados de *X. citri* advindos de citros são mais próximos aos isolados de teca. No mesmo clado encontram-se isolados provenientes de feijão, todos *X. citri* pv. *fuscans* de acordo com a nova classificação. Entretanto, algumas pv. *fuscans* originárias de feijão encontram-se em um clado separado e mais distante dos isolados deste estudo (Figura 9).

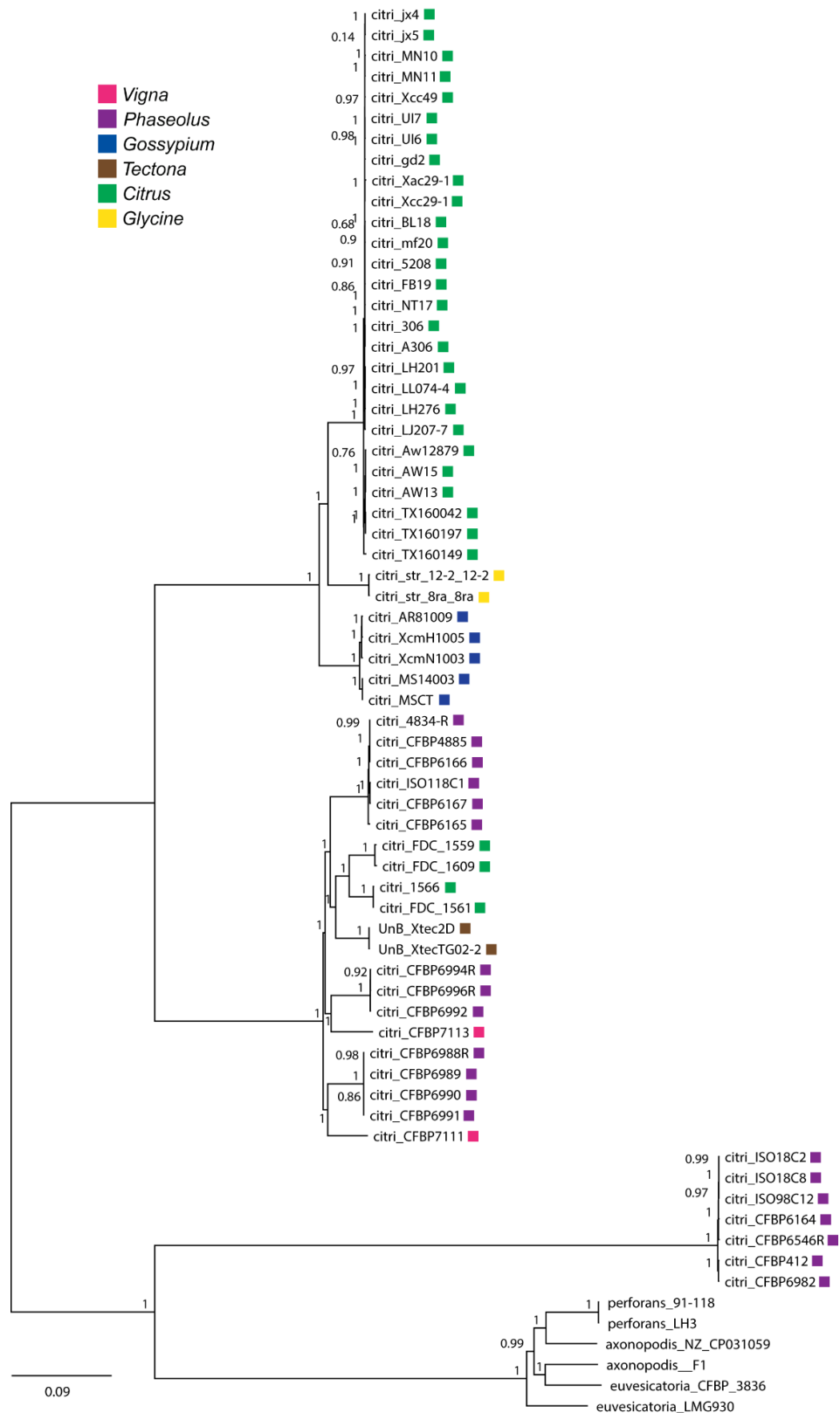


Figura 9. Árvore filogenômica de SNPs de isolados de *Xanthomonas* montada por FastTree, modelo GTR, com remoção prévia de sítios recombinantes. *Xanthomonas euvesicatoria* foi usada como *outgroup*.

Sistemas de secreção

Os sistemas de secreção do tipo I, II, III, IV, V e VI foram buscados e identificados como presentes nos isolados sequenciados UnB-Xtec2D e UnB-XtecTg02(2).

No sistema de secreção do tipo I, os genes *abc*, *mfp* e *omf* foram localizados, todos essenciais para o SST1. O sistema de secreção do tipo II pode ter de 12 a 16 componentes (Abby et al. 2016) e neste trabalho localizou-se nove genes conservados: *gspM*, *gspK*, *gspJ*, *gspI*, *gspH*, *gspG*, *gspF*, *gspE*, *gspD* e três genes com sequências menos conservadas: *gspN*, *gspL* e *gspC*. O SST3 não flagelar dos isolados de teca conta com nove genes core: *gspD*, *sctT*, *sctN*, *sctJ*, *sctU*, *sctV*, *sctQ*, *sctR* e *sctS* e não possui outros genes que estão presente na maior parte dos sistemas (Abby e Rocha 2012), mas encontra-se de acordo com o modelo do programa utilizado (Abby e Rocha 2017). O sistema do tipo IV aparece em duas diferentes versões: a primeira ligada à conjugação devido a presença de uma *relaxase* (MOBB) (Guglielmini et al. 2014) e apresenta 21 genes no total, sendo três conservados: MOBB, *t4cp1* e *virb4* e 18 não conservados: *virb4*, *tfc10*, *tfc11*, *tfc12*, *tfc13*, *tfc14*, *tfc15*, *tfc18*, *tfc19*, *tfc2*, *tfc22*, *tfc23*, *tfc23*, *tfc3*, *tfc5*, *tfc7*, *tfc8*, *tfc9* e *virB1*; a segunda versão codifica para o *pilus* do tipo IV com 11 genes e encontra-se de acordo com o sistema previsto em *Xanthomonas* com pequenas variações (Dunger et al. 2016). O SST5 possui três subtipos e o programa localizou três deles nos isolados: T5aSS (*PF03797*), T5bSS (*translocator*) e T5cSS (*PF03895*) de acordo com o modelo proposto (Abby et al. 2016). O SST6 possui 12 genes: *tssB*, *tssC*, *tssD*, *tssE*, *tssF*, *tssG*, *tssH*, *evpJ*, *tssI*, *tssK*, *tssL* e *tssM* e ausência de *tssA* e *tssJ*.

Efetores do SST3

Dos 65 efetores conhecidos, listados no Xanthomonas.org e avaliados dentre os 23 genomas de *Xanthomonas citri* escolhidos após análise de ANI, dez destes estão presentes em todos os genomas estudados: XopA, HapA, XopAU, XopAZ, XopF2, XopJ5, XopN, XopQ,

XopX e XopZ1 e 27 são ausentes em todos os genomas. XopAG aparenta ser exclusivo entre isolados de teca e isolado CFBP 7113 (*Vigna unguiculata*). XopE2 e XopE1 estão ausentes apenas nos isolados de teca e presentes nos isolados dos demais hospedeiros. XopAD encontra-se ausente apenas nos isolados de teca e no isolado CFBP 7111 (*V. unguiculata*), XopF1 está ausente apenas nos isolados de teca e no isolados FDC 1561 e FDC 1566 de *Citrus* spp. (Figura 10).

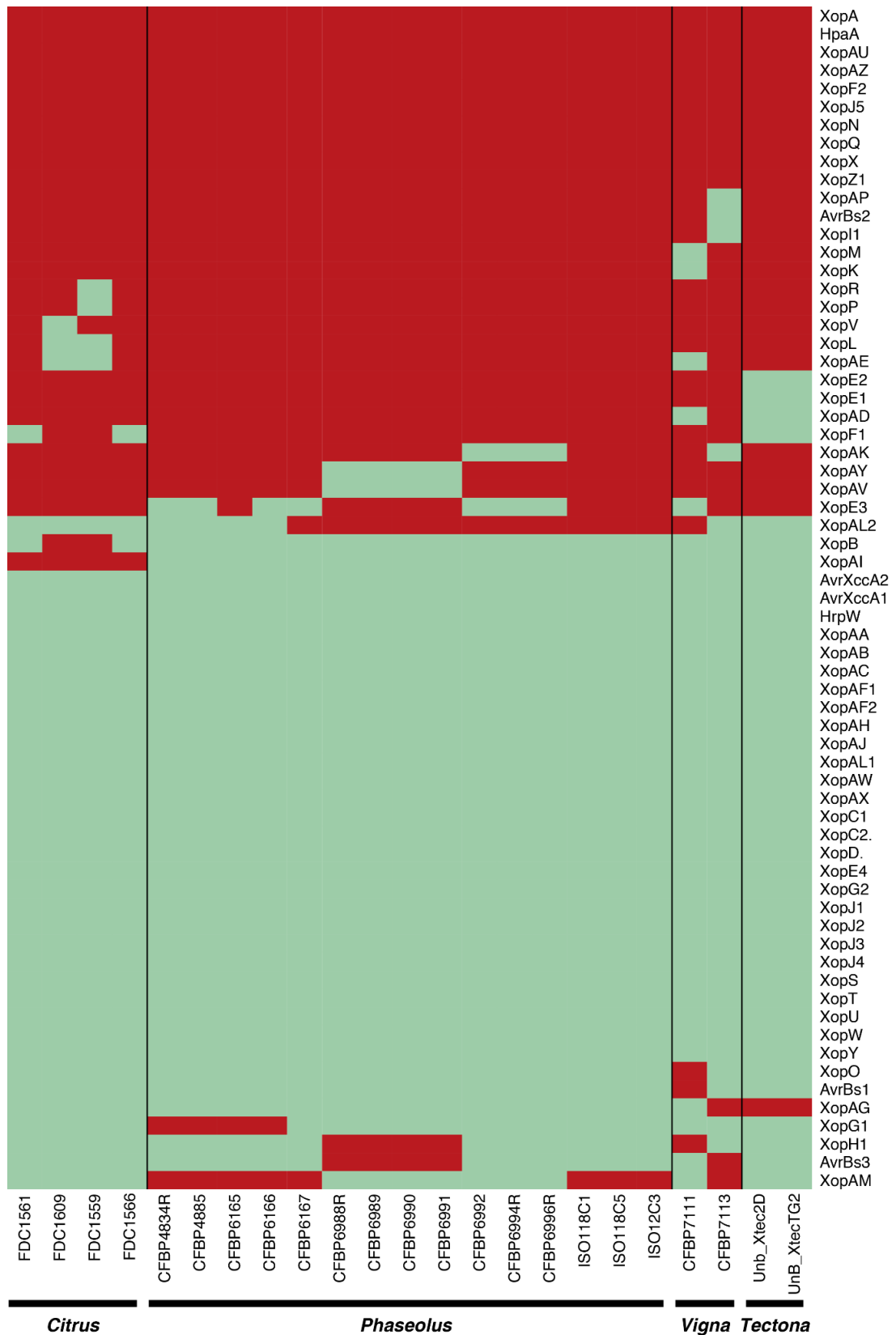


Figura 10. Matriz de ausência e presença de efetores identificados em 23 genomas de *Xanthomonas*. Presença = vermelho, ausência = verde.

Análise de recombinação

Dos 65 efetores descritos para *Xanthomonas*, um total de 24 efetores foram mapeados no genoma de UnB-Xtec2D e foram comparados com as regiões identificadas como recombinantes (Figura 11). Dos 24 efetores identificados nos isolados de teca, 13 efetores estão localizados em regiões no qual não há indícios de recombinação e 11 deles encontram-se em regiões nas quais houve processos de recombinação. Os efetores e coordenadas no genoma encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Efetores mapeados no genoma de UnB-Xtec2D, coordenadas e presença ou ausência de recombinações nas regiões com efetores.

Efetor	Coordenada no genoma (pb)	Recombinação
AvrBs2	57.192-59.333	NÃO
XopAG	229.629-230.894	SIM
XopR	306.454-307.032	SIM
XopAE	453.321-454.961	SIM
HpaA	468.001-468.813	SIM
XopA	4829.49-483.257	SIM
XopM	484.588-485.636	NÃO
XopX	621.778-623.853	NÃO
XopV	715.494-716.294	NÃO
XopI1	905.103-906.305	NÃO
XopAU	1.351.650-1.352.696	SIM
XopAY	1.353.629-1.354.339	SIM
XopP	1.399.571-1.401.712	NÃO
XopAZ	1.606.482-1.606.952	NÃO
XopZ1	2.389.105-2.392.974	SIM
XopE3	2.516.300-2.616.367	NÃO
XopF2	3.298.457-3.298.915	NÃO
XopN	3.301.589-3.303.787	NÃO
XopAP	3.509.093-3.510.166	NÃO
XopJ5	3.522.590-3.523.321	NÃO
XopK	3.626.310-3.628.376	SIM
XopL	3.632.112-3.633.725	SIM
XopAK	4.322.238-4.322.651	SIM
XopQ	5.094.804-5.096.195	NÃO

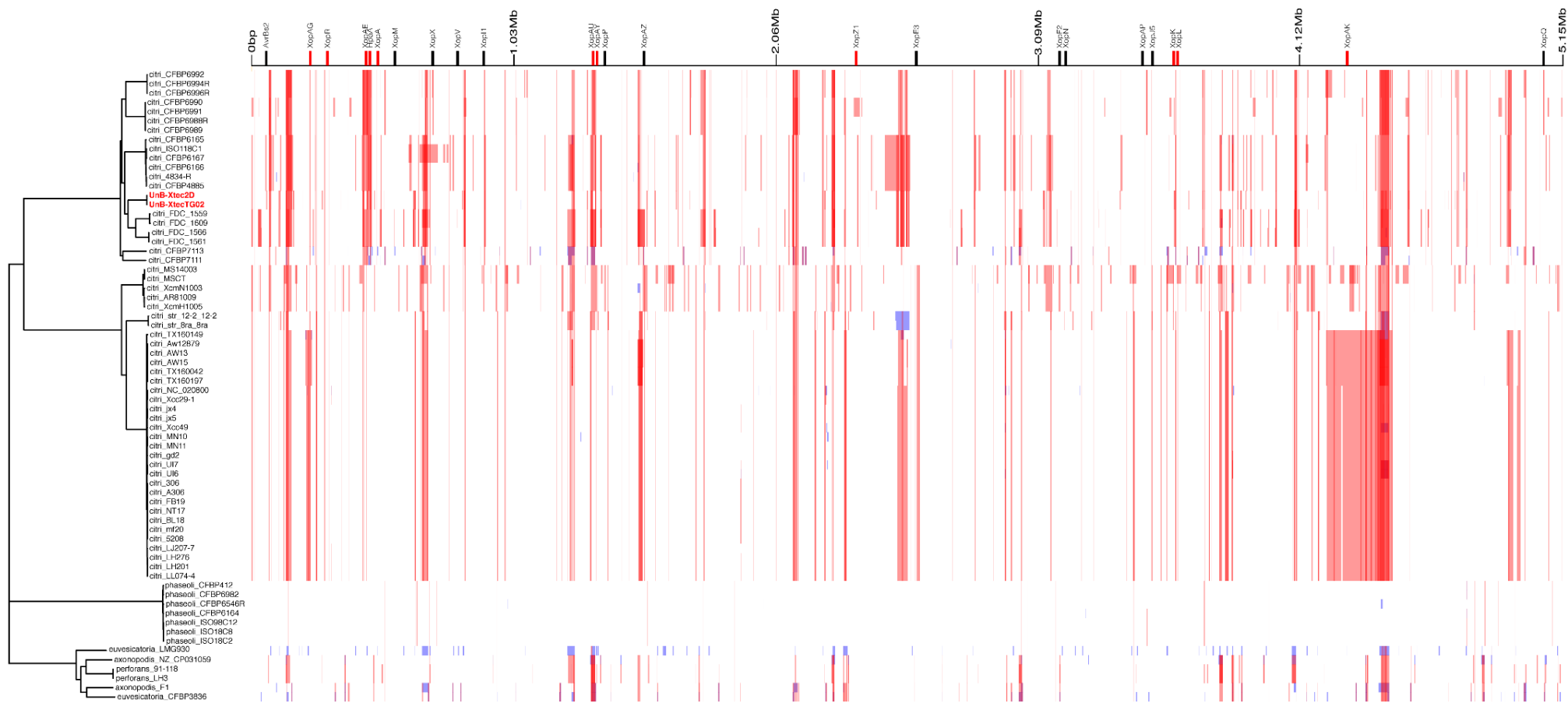


Figura 11. Regiões de recombinação no genoma de UnB-Xtec2D. Efeitores em vermelho: recombinação presente. Efeitores em preto: recombinação ausente.

Gama de hospedeiro

Nenhuma das plantas não inoculadas, independente da espécie hospedeira, apresentou sintomas progressivos, ou seja, que evoluíram ao longo do tempo. Notou-se lesões necróticas próximas ao ponto de perfuração, o qual foram levadas em consideração na análise, comparando-se estas às lesões de plantas inoculadas. O isolamento do tecido próximo ao ponto de perfuração foi realizado, o qual não houve crescimento bacteriano em placa. Em *T. grandis*, o isolado UnB-XtecTg02(2) causou discretos sintomas em folha e o isolado UnB-XtecFFT1 (Figura 12C-D) causou sintomas típicos, com manchas necróticas e halo amarelo circundando a lesão (Figura 12E-F). O isolamento do tecido próximo ao ponto de inoculação resultou em colônias amarelas, mucoides, típicas do gênero *Xanthomonas* para os dois isolados (Figura 19). Para *Citrus*, não houve manifestação de sintomas independente do isolado. As plantas não inoculadas apresentaram leves sintomas de necrose no ponto onde houve perfuração, as quais também foram observadas nos indivíduos inoculados, porém sem progresso da lesão (Figura 13). Não houve crescimento bacteriano em placa após o isolamento. Em plantas de *Eucalyptus* spp., o isolado UnB-XtecTg02(2) causou leves sintomas próximos do ponto de inoculação (Figura 14C-D), enquanto o isolado UnB-XtecFFT1 causou sintomas mais intensos, extrapolando o ponto de inoculação (Figura 14E-F). Quando isoladas, houve crescimento de colônias típicas apenas do isolado UnB-XtecFFT1 (Figura 19). Os sintomas provocados pelos isolados foram discrepantes em relação aos sintomas no controle negativo, apesar de haver leve necrose neste (Figura 14G-H). Plantas de *C. citridora* responderam diferentemente aos isolados. Enquanto os sintomas provocados por UnB-XtecTg02(2) foram leves em *C. citridora* com lesões pequenas e avermelhadas (Figura 15C-D), o isolado UnB-XtecFFT1 causou sintomas mais severos, com maiores lesões necróticas intensas (Figura 15E-F), ambos distintos do controle negativo (Figura 15A-H). O crescimento bacteriano de colônias amarelas e

mucoides foi observado apenas para o isolado UnB-XtecFFT1 (Figura 19). A inoculação em plantas de feijão resultou em doença para os feijões carioca (Figura 16) e preto (Figura 17) ocasionando necrose coalescendo entre os pontos de perfuração e nítido halo amarelo, mas nenhum isolado foi capaz de causar sintomas em feijão caupi (Figura 18). O isolamento resultou em crescimento para todos os isolados em todas as hospedeiras. *Vigna* spp. não apresentou sintoma, mas colônias de *Xanthomonas* foram obtidas após isolamento, indicando que a bactéria foi capaz de sobreviver na hospedeira (Figura 20).

A fim de confirmar se as bactérias isoladas pertenciam ao gênero *Xanthomonas*, realizou-se PCR com *primers* específicos (X-gumD F7/R7). Em *T. grandis*, confirmou-se a presença da bactéria do gênero de interesse. Assim, os isolados UnB-XtecTg02(2) e UnB-XtecFFT1 foram capazes de causar sintomas em sua hospedeira original, havendo, entretanto, variação na intensidade do sintoma. Como não houve crescimento do isolado UnB-XtecTg02(2) em plantas de *Eucalyptus* spp. e *C. citridora*, colônias características do isolado UnB-XtecFFT1 foram repicadas para realizar o procedimento de PCR. Confirmou-se a presença do gênero em ambas as plantas. Ambos isolados: UnB-XtecTg02(2) e UnB-XtecFFT1, foram capazes de causar sintomas em *Phaseolus* spp., mas não em *V. unguiculata*., mas a PCR identificou *Xanthomonas* em ambas as hospedeiras.

Os isolados de teca foram capazes de infectar além de teca, *Eucalyptus* spp., *C. citridora* e *P. vulgaris* (Tabela 5). O isolado UnB-XtecTg02(2) não foi encontrado a partir dos isolamentos de folhas de *Eucalyptus* spp. e *C. citridora* (Tabela 6).

Tabela 5. Avaliação da presença de sintomas em plantas hospedeiras em resposta à inoculação com isolados de *X. citri* pv. *tectonae* UnB-XtecTg02(2) e UnB-XtecFFT1.

	UnB-XtecTg02(2)	UnB-XtecFFT1
<i>Tectona grandis</i>	+	+
<i>Citrus</i> spp.	-	-
<i>Eucalyptus</i> spp.	+	+
<i>Corymbia citridora</i>	+	+
<i>Phaseolus vulgaris</i> (Feijão preto)	+	+
<i>Phaseolus vulgaris</i> (Feijão carioca)	+	+
<i>Vigna unguiculata</i>	-	-

Tabela 6. Isolamento de bactérias do gênero *Xanthomonas* em plantas de diferentes espécies inoculadas com dois isolados de *X. citri* pv. *tectonae*. (+):presença de colônias após isolamento e (-): ausência de colônias após isolamento.

	UnB-XtecTg02(2)	UnB-XtecFFT1
<i>Tectona grandis</i>	+	+
<i>Eucalyptus</i> spp.	-	+
<i>Corymbia citridora</i>	-	+
<i>Phaseolus vulgaris</i> (Feijão preto)	+	+
<i>Phaseolus vulgaris</i> (Feijão carioca)	+	+
<i>Vigna unguiculata</i> (Feijão caupi)	+	+

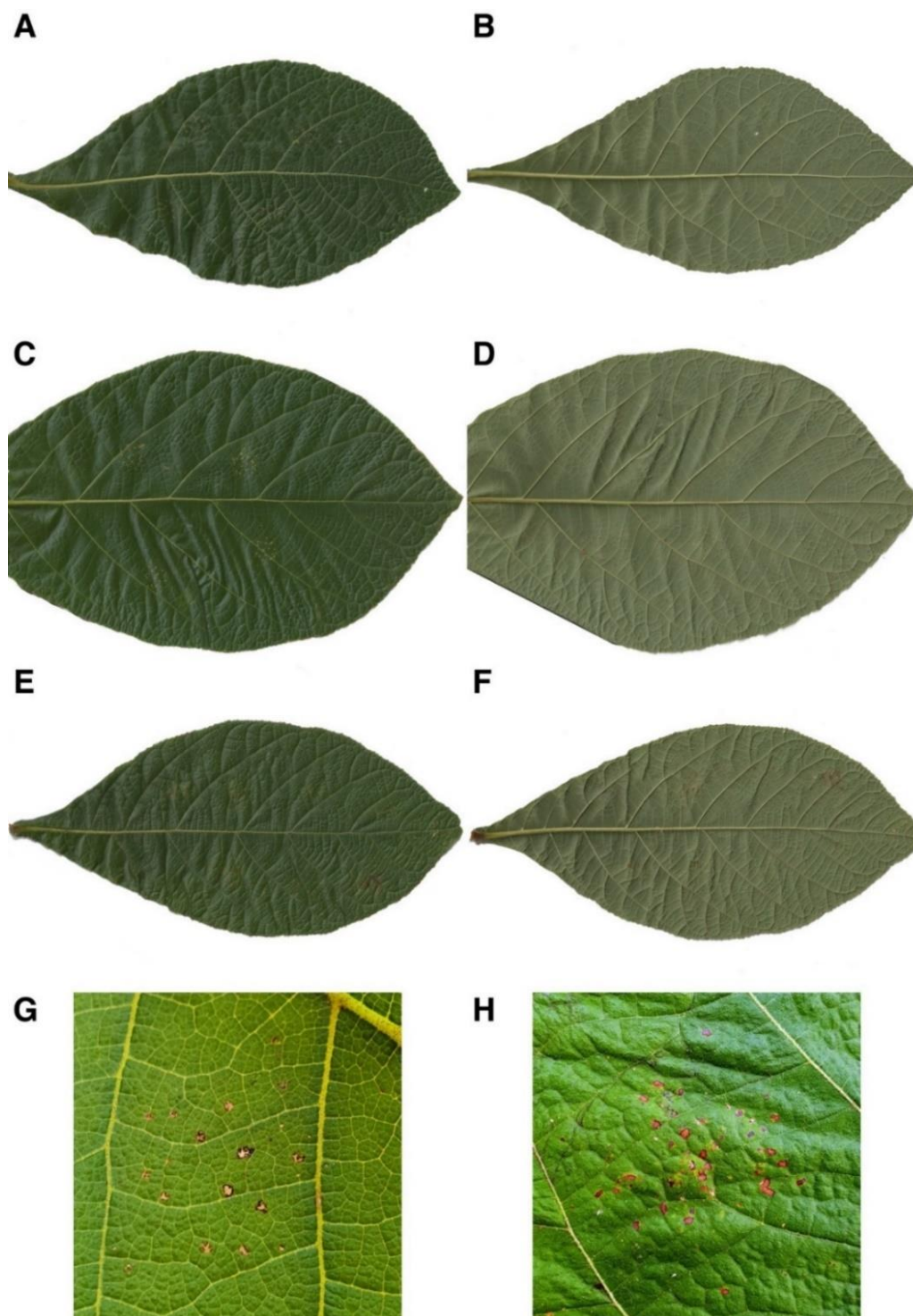


Figura 12. Sintomas causados por *Xanthomonas citri* pv. *tectonae* em *Tectona grandis*. (A) Controle negativo (água destilada) em superfície adaxial; (B) Controle negativo (água destilada) em superfície abaxial; (C) UnB-XtecTg02(2) na superfície adaxial; (D) UnB-XtecTg02(2) na superfície abaxial; (E) UnB-XtecFFT1 na superfície adaxial; (F) UnB-XtecFFT1 na superfície abaxial; (G) Controle negativo ampliado; (H) Sintomas causados por UnB-XtecFFT1 ampliado. Digitalizações realizadas quatro semanas após inoculação.

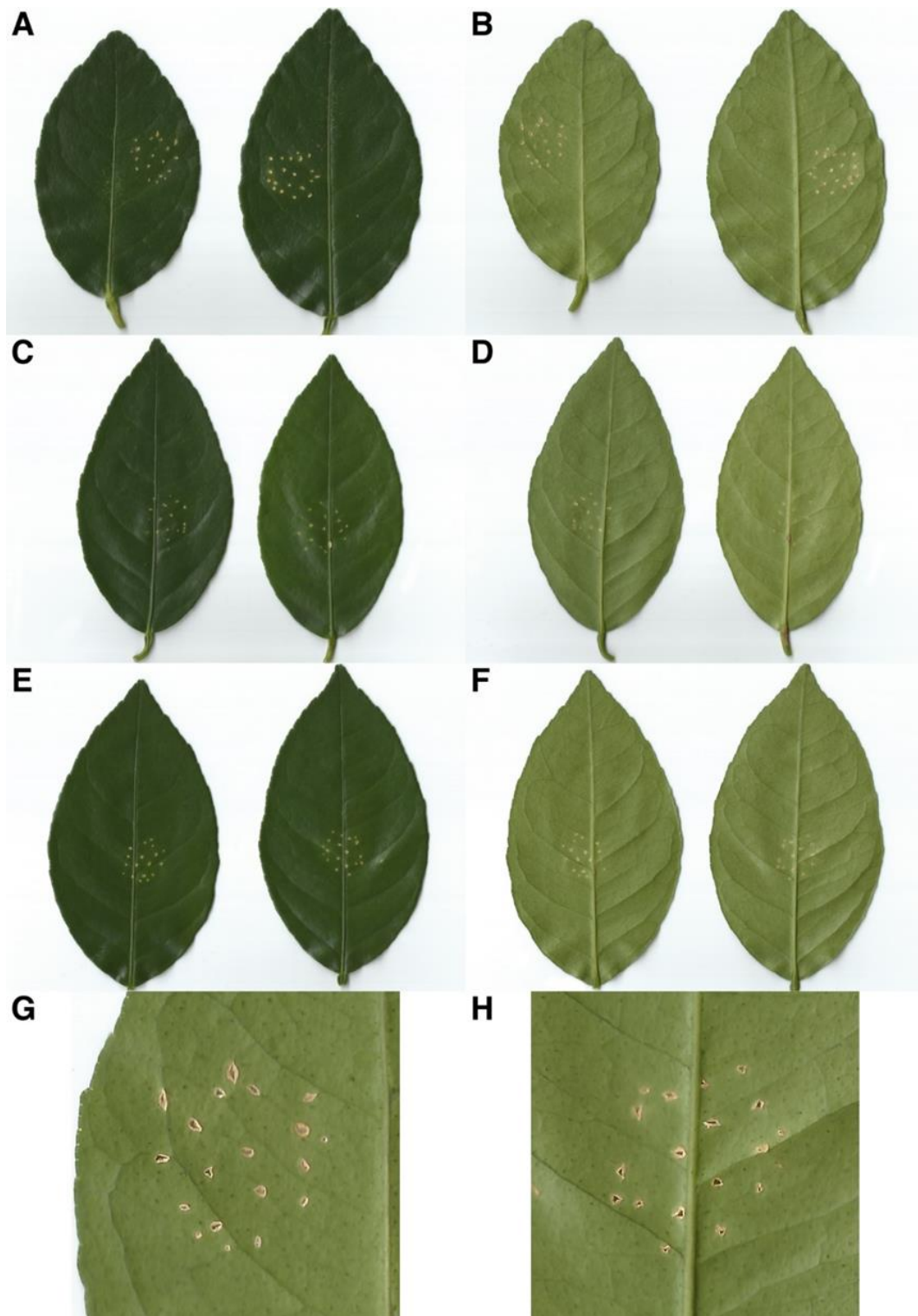


Figura 13. Sintomas causados por *Xanthomonas citri* pv. *tectonae* em *Citrus* spp. (A) Controle negativo (água destilada) em superfície adaxial; (B) Controle negativo (água destilada) em superfície abaxial; (C) UnB-XtecTg02(2) na superfície adaxial; (D) UnB-XtecTg02(2) na superfície abaxial; (E) UnB-XtecFFT1 na superfície adaxial; (F) UnB-XtecFFT1 na superfície abaxial; (G) Controle negativo ampliado; (H) Sintomas causados por UnB-XtecFFT1 ampliado. Digitalizações realizadas quatro semanas após inoculação.

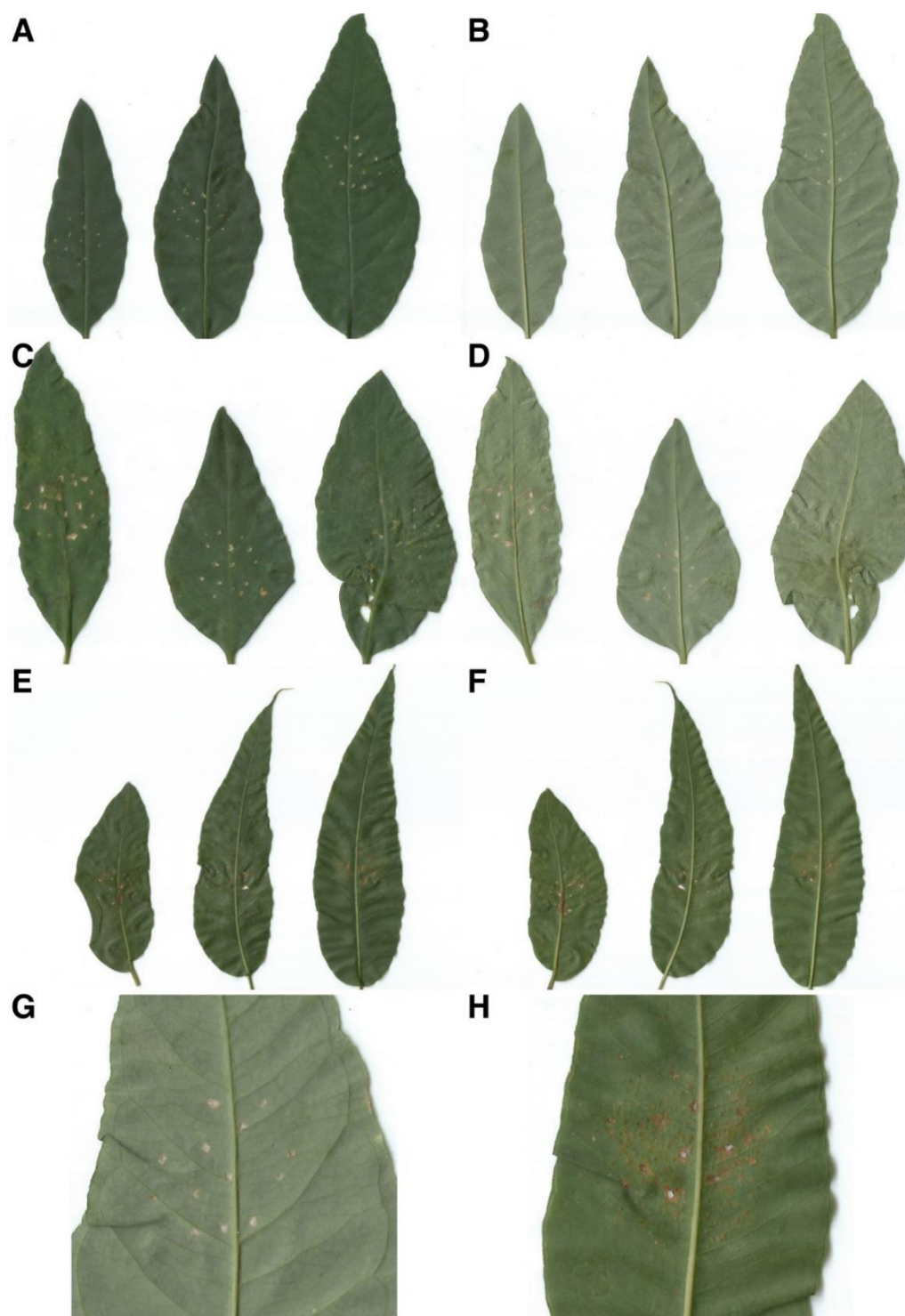


Figura 14. Sintomas causados por *Xanthomonas citri* pv. *tectonae* em *Eucalyptus* spp. (A) Controle negativo (água destilada) em superfície adaxial; (B) Controle negativo (água destilada) em superfície abaxial; (C) UnB-XtecTg02(2) na superfície adaxial; (D) UnB-XtecTg02(2) na superfície abaxial; (E) UnB-XtecFFT1 na superfície adaxial; (F) UnB-XtecFFT1 na superfície abaxial; (G) Controle negativo ampliado; (H) Sintomas causados por UnB-XtecFFT1 ampliado. Digitalizações realizadas quatro semanas após inoculação.

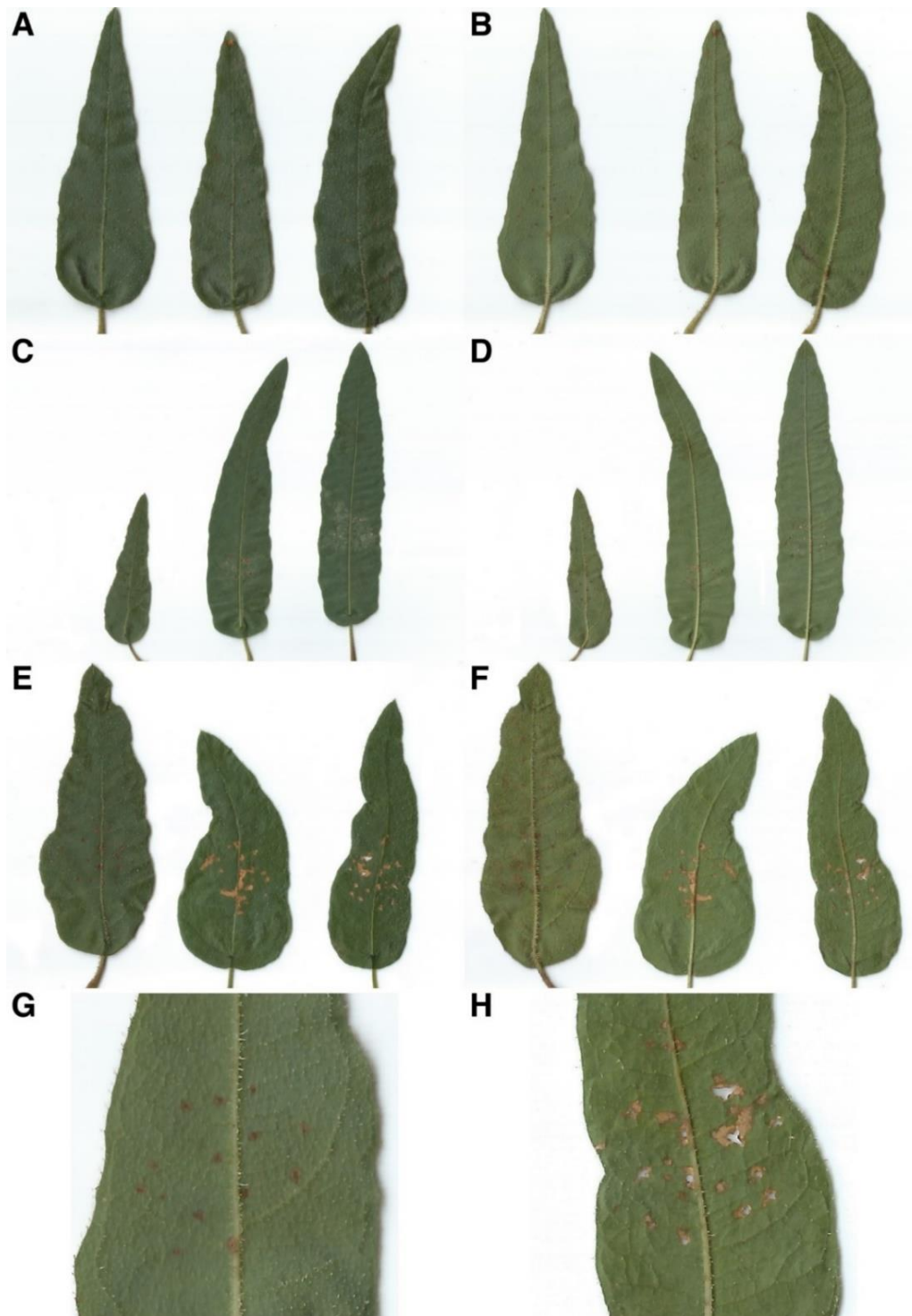


Figura 15. Sintomas causados por *Xanthomonas citri* pv. *tectonae* em *Corymbia* spp. (A) Controle negativo (água destilada) em superfície adaxial; (B) Controle negativo (água destilada) em superfície abaxial; (C) UnB-XtecTg02 na superfície adaxial; (D) UnB-XtecTg02(2) na superfície abaxial; (E) UnB-XtecFFT1 na superfície adaxial; (F) UnB-XtecFFT1 na superfície abaxial; (G) Controle negativo ampliado; (H) Sintomas causados por UnB-XtecFFT1 em maior aumento. Digitalizações realizadas quatro semanas após inoculação.

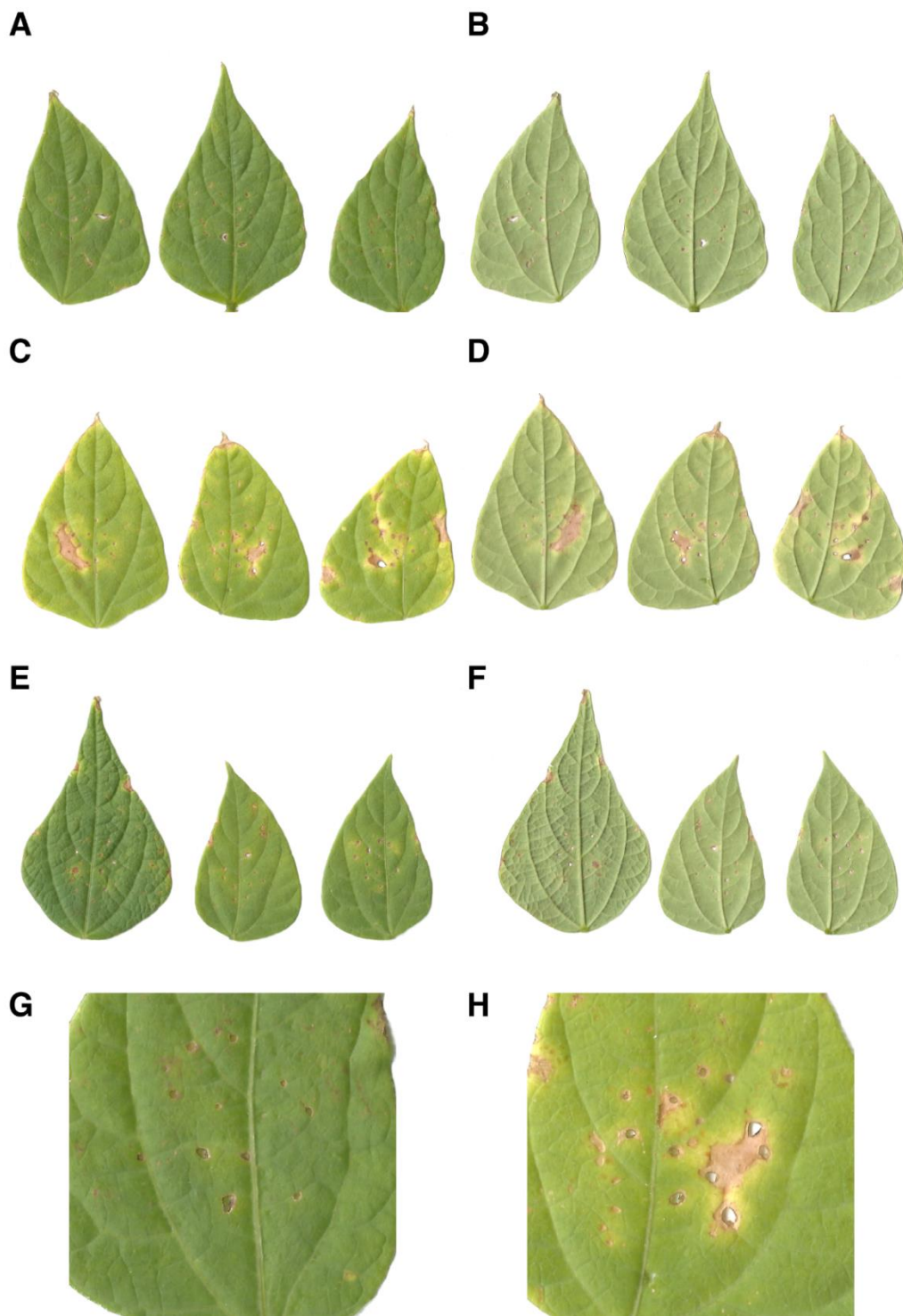


Figura 16. Sintomas causados por *Xanthomonas citri* pv. *tectonae* em *Phaseolus* spp. (Feijão preto). (A) Controle negativo (água destilada) em superfície adaxial; (B) Controle negativo (água destilada) em superfície abaxial; (C) UnB-XtecTg02(2) na superfície adaxial; (D) UnB-XtecTg02(2) na superfície abaxial; (E) UnB-XtecFFT1 na superfície adaxial; (F) UnB-XtecFFT1 na superfície abaxial; (G) Controle negativo ampliado; (H) Sintomas causados por UnB-XtecTg02(2) ampliado. Digitalizações realizadas quatro semanas após inoculação.

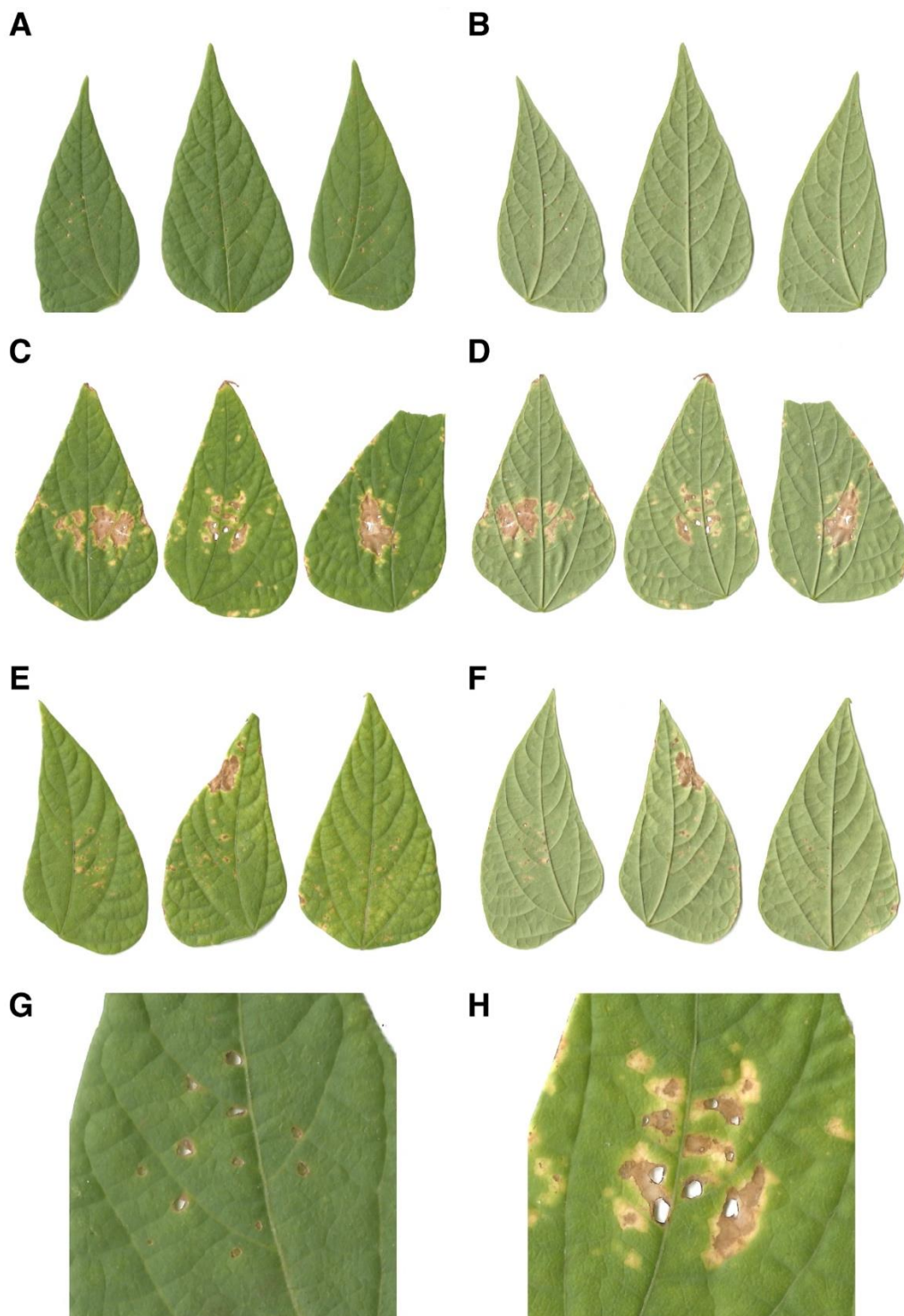


Figura 17. Sintomas causados por *Xanthomonas citri* pv. *tectonae* em *Phaseolus* spp. (Feijão carioca). (A) Controle negativo (água destilada) em superfície adaxial; (B) Controle negativo (água destilada) em superfície abaxial; (C) UnB-XtecTg02(2) na superfície adaxial; (D) UnB-XtecTg02 na superfície abaxial; (E) UnB-XtecFFT1 na superfície adaxial; (F) UnB-XtecFFT1 na superfície abaxial; (G) Controle negativo ampliado; (H) Sintomas causados por UnB-XtecTg02(2) em maior aumento. Digitalizações realizadas quatro semanas após inoculação.

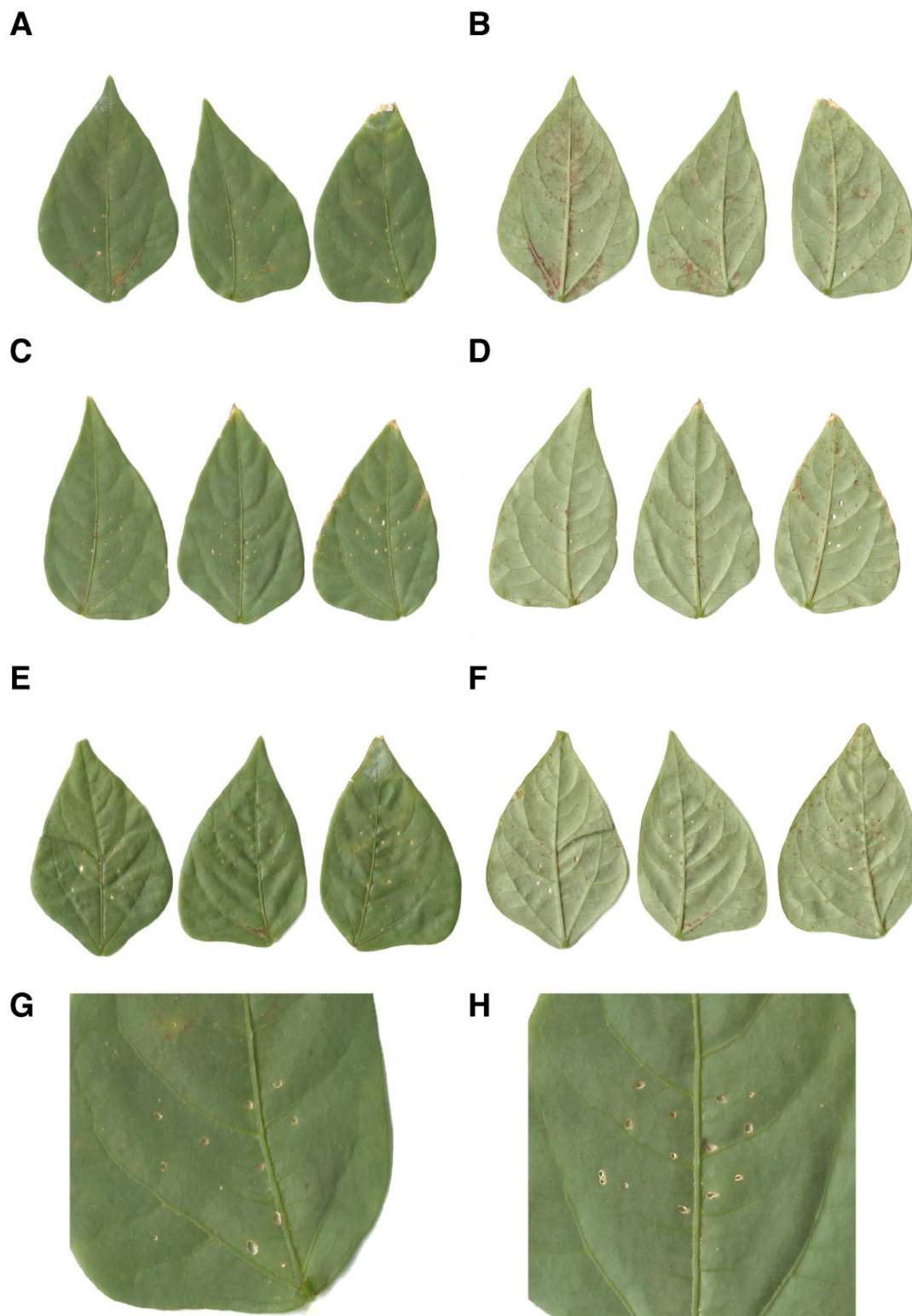


Figura 18. Sintomas causados por *Xanthomonas citri* pv. *tectonae* em *Vigna unguiculata* (Feijão caupi cv. Guariba). (A) Controle negativo (água destilada) em superfície adaxial; (B) Controle negativo (água destilada) em superfície abaxial; (C) UnB-XtecTg02(2) na superfície adaxial; (D) UnB-XtecTg02(2) na superfície abaxial; (E) UnB-XtecFFT1 na superfície adaxial; (F) UnB-XtecFFT1 na superfície abaxial; (G) Controle negativo ampliado; (H) Sintomas

causados por UnB-XtecTg02(2) ampliado. Digitalizações realizadas quatro semanas após inoculação.

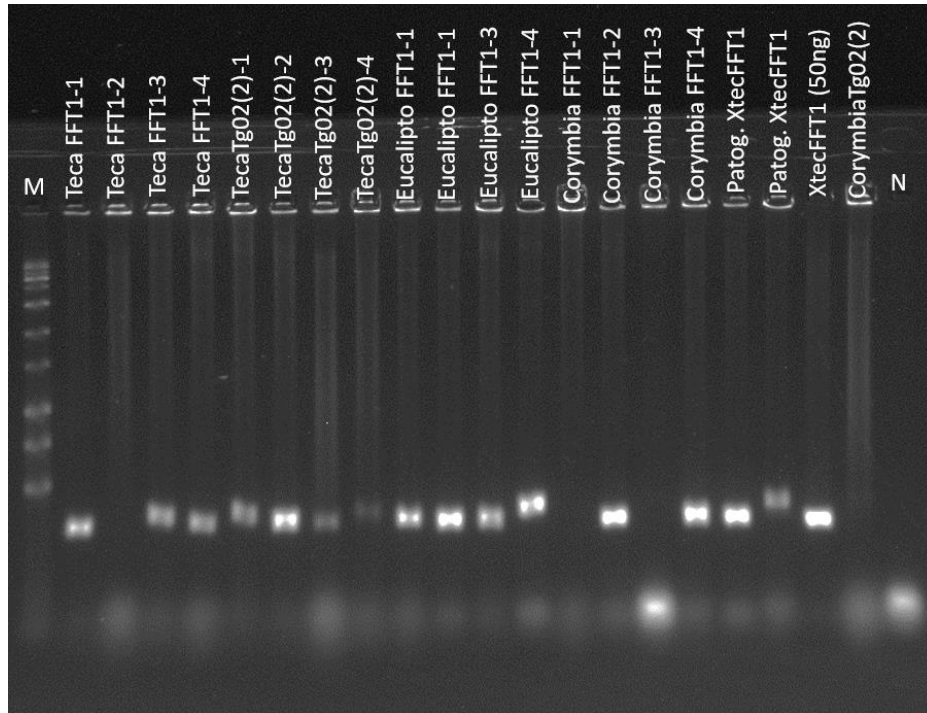


Figura 19. Produto da PCR com os *primers* X-gumD F7/R7 visando detecção do gene *gumD* (402 pb) obtidos após gama de hospedeiras. M: marcador DNA ladder 1 Kb Ludwig. N: controle negativo

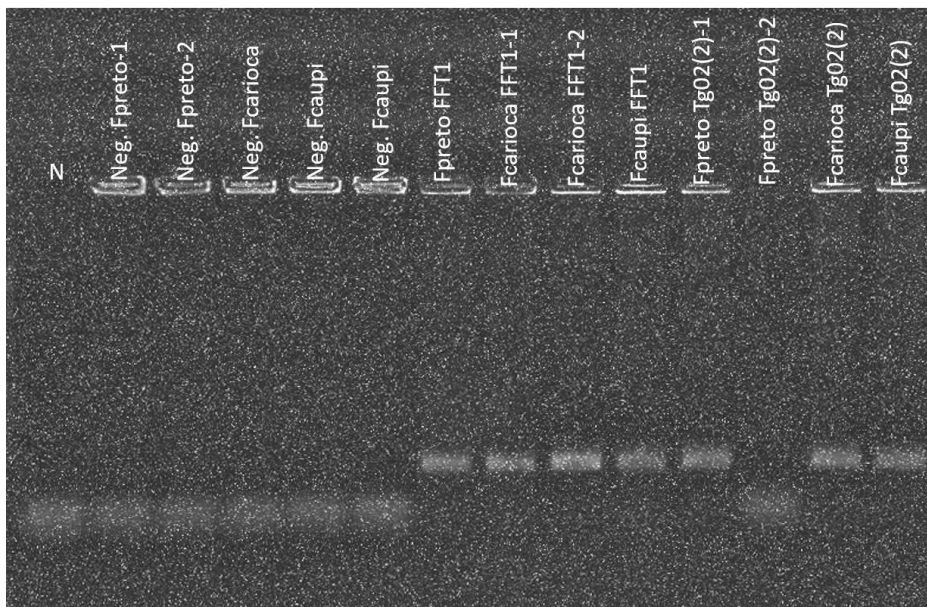


Figura 20. Produto da PCR com os *primers* X-gumD F7/R7 visando detecção do gene *gumD* (402 pb) obtidos após gama de hospedeiras. M: marcador DNA ladder 1 Kb Ludwig. N: controle negativo. Neg.: plantas do controle negativo. Fpreto: feijão preto. Fcarioca: feijão carioca. Fcaupi: feijão caupi.

Identificação de genes de insensibilidade ao cobre (COP)

Geralmente presentes em plasmídeos de isolados insensíveis ao cobre, os genes *cop*, buscados por BLAST nas ORFs dos genomas sequenciados não foram encontrados. Resultado já esperado diante da ausência de plasmídeos entre os genomas analisados. Os demais isolados foram testados para a presença do gene *copA* por PCR e não houve amplificação do fragmento de 870 pb, confirmando a ausência do *operon* e a possível sensibilidade ao cobre (Figura 21). Somente o isolado P-120 (*Xanthomonas euvesicatoria*) e conhecidamente insensível ao cobre que gerou o fragmento esperado.

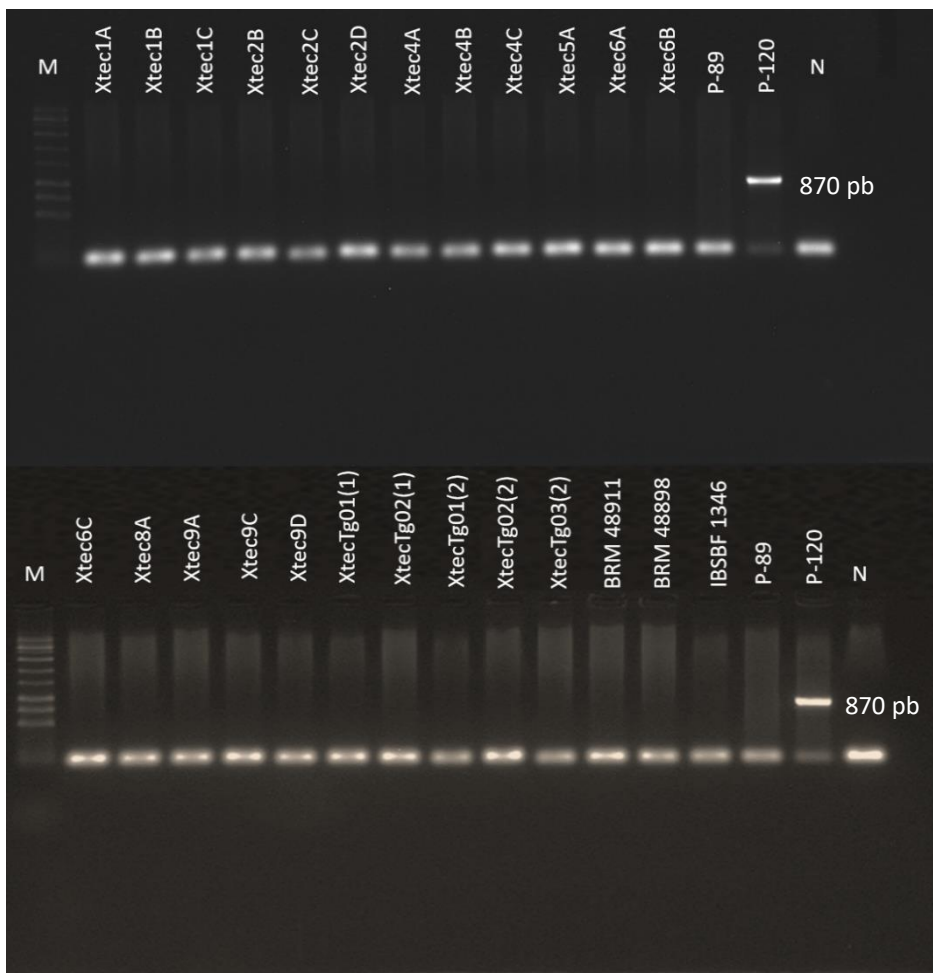


Figura 21. Produto da PCR com os *primers* *copAF/AR* visando detecção do gene *copA*, (870 pb) na coleção de isolados de *Xanthomonas citri* pv. *tectonae*. P-89: isolado sensível ao cobre. P-120: isolado insensível ao cobre. M: marcador DNA ladder 1 Kb Ludwig. N: controle negativo.

5. DISCUSSÃO

Identificadas pela primeira vez em 2018 por Borges et al. (2018c), isolados de *X. fuscans* capazes de infectar plantas de teca em viveiro, até o momento não tiveram uma caracterização, além da taxonômica por MLSA. O presente trabalho analisa uma coleção de isolados por diferentes métodos, visando a caracterização dessa bactéria facilmente encontrada em viveiros de teca no Brasil.

Folhas sintomáticas demonstrando lesões necróticas circundadas por um halo amarelo, foram selecionadas para isolamento, resultando em colônias amarelas e mucóides, típicas do gênero *Xanthomonas*. Pela técnica de PCR confirmou-se o gênero *Xanthomonas*, resultado confiável como apresentado pelo próprio autor dos *primers*, que destaca que somente o DNA das espécies *Xanthomonas hyacinthi*, *Xanthomonas sacchari*, *Xanthomonas theicola* e *Xanthomonas translucens*, não amplificou a região parcial do gene *gumD* (Adriko et al. 2014).

O uso do marcador BOX-PCR demonstrou não haver variação entre os isolados de teca coletados em Mato Grosso e São Paulo, sendo assim considerados clonais. Vários autores já relataram que marcadores moleculares, como REP-PCR, ERIC-PCR e em especial o BOX-PCR são eficientes na análise de diversidade de isolados de várias bactérias, incluindo o gênero *Xanthomonas* (Zhai et al. 2010, Raghavendra et al. 2013, Rouhrazi e Khodakaramian 2014, Ivanović et al. 2015, Araújo et al. 2017). Além de mostrar variações, os marcadores moleculares também podem indicar a ausência de variabilidade genética, ou seja, homogeneidade entre os isolados (Aritua et al. 2007, Odipio et al. 2009, Zamani et al. 2011). Zamani et al. (2011) relatou resultado similar ao deste estudo, no qual os isolados iranianos de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* provenientes de três províncias diferentes foram relativamente homogêneos, com baixa diversidade genética, sugerindo que poucos eventos de introdução tenham acontecido no país e tenha ocorrido a disseminação para as três áreas infectadas.

Pelo perfil clonal entre os isolados de teca, levanta-se duas hipóteses, a primeira é que esse fitopatógeno é exógeno e entrou por material propagativo, e a segunda, que ocorreu a adaptação à um novo hospedeiro (teca).

Para a primeira hipótese, especula-se uma única ou poucas introduções, dado indicado pela homogeneidade genética dos isolados. Podendo ocorrer por via de mudas infectadas ou até mesmo por sementes, algo comum entre espécies de *Xanthomonas* em várias hospedeiras (Okechukwu et al. 2010, Darrasse et al. 2018, Arias et al. 2020). A entrada de um patógeno em uma nova área acontece devido a fluxo de material propagativo sem os devidos cuidados quarentenários (Boudon et al. 2005, Shimwela et al. 2017). Portanto, mais estudos seriam necessários para verificar a sobrevivência da bactéria em sementes de teca, algo que poderia trazer luz à possível meio de entrada do patógeno. Não é possível datar com precisão os primeiros relatos de *Xanthomonas* em teca no Brasil, já que a doença é amplamente conhecida entre produtores de mudas, porém o primeiro relato na literatura é de 2018 (Borges et al. 2018c).

Na segunda hipótese seria um processo de adaptação à teca, ou seja, um evento de *host jump* ou *host shift*, em que um fitopatógeno poderia ter se adaptado à uma nova hospedeira (Schulze-Lefert e Panstruga 2011). Essa mudança de hospedeiro foi relatada em outras *Xanthomonas*, como por Coutinho et al. (2015), quando isolados de *X. vasicola*, originalmente associados com cana de açúcar foram encontrados em eucalipto e por Bophela et al. (2019), quando *X. perforans*, típica de tomate foi encontrada causando crestamento e *dieback* em eucalipto. Dependendo do tempo decorrido entre a adaptação e a disseminação, poderia resultar em uma baixa variabilidade da população, como descrito para *Xylella fastidiosa* subsp. *morus*, a qual apresenta reduzida diversidade genética e especula-se que seja um novo patógeno resultante de eventos de recombinação entre espécies de *Xylella* (Nunney et al. 2014).

Por meio de MLSA demonstrou-se que os isolados de teca não representam uma nova espécie, mas pertencem à espécie *X. citri*, estando mais próximos de *Xanthomonas* patogênicas ao feijoeiro, separadas em um subclado próprio com elevados valores de probabilidade posterior. Os isolados de *Xanthomonas* em teca foram descritos inequivocadamente como *X. fuscans* em 2018 (Borges et al. 2018c), pois segundo a recente classificação proposta por Constantin et al. (2016), a espécie em questão é uma *X. citri*. Os isolados de teca apresentaram valores de ANI de 96% quando comparados a isolados de *Citrus* spp. e 98% em relação aos isolados de *P. vulgaris*, ambos superiores a 95%, considerado o limiar para determinação de uma espécie pelo uso dessa técnica (Richter e Rosselló-Móra 2009). Assim, os resultados da análise de ANI confirmam MLSA. Constantin et al. (2016) encontraram congruência entre os dados de ANI e MLSA, no qual estirpes compartilhando 95% no ANI obtiveram pelo menos $\geq 98,7\%$ em similaridade de sequência MLSA. Outros autores encontraram o mesmo, Pieretti et al. (2015) confirmam o resultado de ANI por análise filogenética com MLSA e propõe uma nova espécie muito próxima geneticamente *X. albilineans*, *X. pseudalbilineans*; Vicente et al. (2017) observa que tanto MLSA quanto ANI classificam isolados de agrião como uma espécie distinta das espécies de *Xanthomonas* já conhecidas, reforçando ser uma nova espécie, *Xanthomonas nasturtii*; López et al. (2018) propuseram a espécie *Xanthomonas prunicola* suportada por resultados de MLSA e ANI.

No presente trabalho também foi testada uma técnica para a divisão de espécie usando os princípios do ANI, ou análise de identidade de sequências, porém somente com sequências de genes de *housekeeping*. Pelos valores foi possível confirmar que essa técnica, que evita a necessidade de usar o genoma completo, também identifica os limiares entre espécies. Young et al. (2008) utilizou matriz de similaridade e apontou o seu possível uso em substituição ao método de reassociação DNA-DNA.

Xanthomonas axonopodis pv. *melhusii* foi incluída nas análises filogenéticas por ter sido isolada de teca em 1952 na Índia (Patel et al. 1952) que é também o centro de origem dessa espécie vegetal. Entretanto, a análise confirma a distância filogenética entre esta e os isolados brasileiros de teca (Figura 6), reforçando a possibilidade de entrada de um variante desconhecido ou de um *host jump* de isolados brasileiros. A patovar não foi incluída nas demais análises por estar com regiões do genoma incompletas, o que poderia prejudicar as análises e gerar resultados enviesados.

Tectona grandis pode ser cultivada em viveiros onde há a presença de outras espécies, como *Eucalyptus* spp. Ferraz et al. (2018) propôs a patovar *X. axonopodis* pv. *eucalyptorum*, capaz de infectar *Eucalyptus* spp. e outras espécies da família Myrtaceae em experimento de gama de hospedeiro. Com a finalidade de verificar se os isolados de teca pertencem à *X. axonopodis* pv. *eucalyptorum*, realizou-se uma nova análise de MLSA, a qual confirmou se tratarem de isolados distintos e filogeneticamente distantes. Contudo, a espécie *X. axonopodis* pv. *eucalyptorum* foi agrupada com *Xanthomonas citri* e, de acordo com a recente proposta de classificação, deveriam ser consideradas *Xanthomonas citri* pv. *eucalyptorum* (Constantin et al. 2016).

A análise de filogenômica baseada nos SNPs do genoma completo identificou os isolados de teca como mais próximos de bactérias especializadas em hospedeiros cítricos. Esse resultado juntamente com ANI e MLSA podem sugerir um ancestral comum de *X. citri*, no qual o processo de evolução levou a diferenciação a diferentes hospedeiros. A análise de SNPs apresenta alta resolução e desconsidera fatores que podem interferir negativamente na análise como eventos de recombinação (Schürch et al. 2018). Aritua et al. (2015) observou que a análise de SNPs apresentou maior resolução do que MLSA com seis genes, revelando a presença de sub-linhagens dentro de cada linhagem. Resultado semelhante foi obtido por Schwartz et al.

(2015) no qual a análise com SNP permitiu a separação de isolados geneticamente muito próximos de espécies causadoras de mancha bacteriana em tomate e pimentão. A filogenia de SNP também contribuiu para a identificação de *X. vasicola* pv. *vasculorum* em amostras de milho (Plazas et al. 2018). Essa análise corrobora o encontrado nas anteriores, como ANI e MLSA, porém com algumas alterações quanto a distância entre os isolados.

Os isolados de teca foram capazes de causar sintomas em outras plantas hospedeiras, como *Eucalyptus* spp., *Corymbia* spp. e *P. vulgaris*, enquanto as plantas de citros e *Vigna* spp. não foram infectadas. Em eucalipto, doenças de origem bacteriana representam uma grande preocupação e são causadas por diferentes agentes (Coutinho et al. 2002, Coutinho et al. 2015, Ferraz et al. 2018), acarretando prejuízo de milhões apenas no Brasil (Gonçalves et al. 2008). Apesar dos sintomas terem sido provocados por meio de inoculação artificial, o ensaio demonstra a habilidade destas bactérias em causar doença nestas hospedeiras, não devendo ser desconsiderada em condições como viveiros, no qual costuma-se cultivar teca com outras espécies florestais como *Eucalyptus* spp. As espécies *P. vulgaris* e *V. unguiculata* foram selecionadas devido à proximidade dos isolados de teca com isolados dessas hospedeiras nas análises de ANI e MLSA. O ensaio de gama de hospedeiras com essas duas espécies demonstrou a capacidade destes em causar doença às culturas, sugerindo que a origem dos isolados de teca pode vir de alguma adaptação de isolados de feijão, *Corymbia* spp. ou *Eucalyptus* spp., perdendo parte da sua virulência na hospedeira original.

Considerando os dados gerados pelas análises de filogenia MLSA, filogenômica, ANI e gama de hospedeiras, propõe-se aqui a criação de uma nova patovar dentro da espécie *Xanthomonas citri*, a patovar *Tectonae*.

O genoma sequenciado possui um tamanho próximo ao encontrado para o gênero *Xanthomonas* que apresenta grande plasticidade, com genoma variando de maneira geral de

4,8 a 5,3 Mb e conteúdo G+C acima de 60% (Ryan et al. 2011). Essas variações podem ser conferidas por meio de diversos trabalhos contendo sequenciamento de genomas completos (Lee et al. 2005, Bogdanove et al. 2011, Jalan et al. 2013b, Pereira et al. 2015, Richard et al. 2017). Os plasmídeos estão ligados a funções metabólicas e adaptação a hospedeiros, mas não são itens essenciais ao hospedeiro e sua permanência a longo prazo depende se proporcionam efeito de seleção positiva ou melhoram o *fitness* ao hospedeiro e/ou condições ambientais (Sundin 2007). Em 2015, Niu et al. (2015) relata plasmídeo em *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, no qual a estrutura do plasmídeo encontrado sugere múltiplos rearranjos de DNA por transferência horizontal de genes. Resultando semelhante é encontrado por Kaur et al. (2019) estudando o genoma de *X. oryzae* pv. *oryzae* estirpe BXO1, no qual verificou a presença de um plasmídeo que também está presente em *X. albilineans* estirpe GPE PC73, sugerindo a possível relação deste com a adaptação de ambas para o tecido vascular dos seus respectivos hospedeiros. Nenhum plasmídeo foi encontrado nas sequências deste estudo, fato também visto em outras *Xanthomonas*, como *X. campestris* pv. *campestris* (da Silva et al. 2002), *X. oryzae* pv. *oryzae* (Lee et al. 2005), *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Canteros et al. 1995) e até em outros gêneros como *Dickeya* spp. (Alič et al. 2019)

A ausência de plasmídeos nos isolados de teca indicam um repertório inferior para genes associados à virulência e resistência à substâncias antibacterianas, como o cobre, que o *operon cop* se localiza em plasmídeos (Behlau et al. 2013).

Bactérias são alvo constante de elementos genéticos exógenos, mas há sistemas de defesa que as protegem de invasões de DNA exógeno (Horvath e Barrangou 2010). Sequências CRISPR foram descobertas na década de 1980 (Ishino et al. 1987), mas apenas nos anos 2000 notou-se que parte das sequências CRISPR derivam de elementos móveis como bacteriófagos e plasmídeos conjugativos, sugerindo haver função biológica (Mojica et al. 2005, Barrangou et

al. 2007). Essas regiões não foram encontradas em *X. citri* pv. *tectonae*, mas nem todas as bactérias possuem tais elementos CRISPR (Grissa et al. 2007). Não ter regiões CRISPR não significa ser suscetível a qualquer DNA externo, pois há vários outros mecanismos que podem proteger a célula bacteriana de uma invasão (Rostøl et al. 2019).

Todos os sistemas de secreção foram encontrados em *X. citri* pv. *tectonae*. O programa utilizado não encontrou o gene *omf* que faz parte do T1SS, mas os criadores do programa relatam que o sistema pode ser funcional, pois dentre 95 *locus* codificando *abc* e *mfp* com ausência de *omf* em 94 o locus para *omf* foi encontrado em outro *replicon* (Abby et al. 2016). Já sabe-se que fatores de virulência secretados via T1SS tais como: proteases, metaloproteases, adesinas e glicanases podem ser encontrados em bactérias fitopatogênicas (Delepelaire 2004, Alič et al. 2019). O T2SS é composto por 12 a 16 genes (Abby et al. 2016) e o programa encontrou 12 genes para esse sistema. Esse sistema contribui para a patogenicidade de diversas bactérias em plantas devido a liberação pectinases, celulases; espécies como: *Erwinia* (Corbett et al. 2005), *Dickeya* (Alič et al. 2019), *Xanthomonas* (Baptista et al. 2010), *Ralstonia* (Kang et al. 1994) e sua ausência pode levar a perda da capacidade de colonizar sistemicamente e consequente perda de virulência nesta última (Tsujiimoto et al. 2008). O T4SS é um sistema bastante versátil, estando envolvido na conjugação de DNA por pili, secreção de proteínas e efetores na célula do hospedeiro e absorção e liberação de DNA (Cascales e Christie 2003) e sua aplicação pode ser vista em competição com outras bactérias (Souza et al. 2015) e na patogênese de *A. tumefaciens* (Cascales e Christie 2004). Os isolados deste estudo possuem T4SS e T4P, envolvido na formação de pili (pili tipo IV). Este último está envolvido na mobilidade em superfície independente de flagelo: *twitching*, adesão a superfície e formação de biofilme (Li et al. 2007, Jarrell e McBride 2008, Dunger et al. 2014, Granato et al. 2016), absorção de material genético e também na secreção de proteínas (Hager et al. 2006). Espécies

do gênero *Xanthomonas* podem codificar para este sistema, assim como outros gêneros de bactérias fitopatogênicas (Burdman et al. 2011, Dunger et al. 2016). Quanto ao T5SS, as bactérias deste trabalho possuem os tipos T5sSS, T5bSS e T5cSS. O T5SS é dividido em 5 subtipos que são diferenciados quanto a estrutura e modo de secreção. T5aSS é um autotransportador monomérico, T5bSS é um sistema de secreção *two-partner* e T5cSS são autotransportadores triméricos e são normalmente adesinas. Os outros dois tipos foram recentemente propostos e o programa utilizado, em sua construção não possuía modelo para eles, motivo pelo qual possivelmente não tenha sido detectados (Abby et al. 2016). O sistema é encontrado em algumas bactérias do gênero *Xanthomonas* (Pieretti et al. 2012, Darrasse et al. 2013) e para *X.s citri* a mutação de um gene que possivelmente faz parte de T5bSS prejudica a adesão a superfície e formação de biofilme (Mendonça et al. 2017). T5SS é relacionado com secreção de toxinas em *Dickeya* spp. e o arsenal por este produzido pode variar de uma estirpe para outra (Pédron et al. 2014). O T6SS também foi detectado. A maior parte das espécies de *Xanthomonas* possuem o T6SS, mas há casos no qual o sistema não é encontrado, como para *X. albilineans* (Pieretti et al. 2012). Ele é associado principalmente a interação com outras bactérias (Basler et al. 2013), secreção de toxinas (Pédron et al. 2014), mas pode ser associado com a formação de biofilme como visto em *Ralstonia* (Zhang et al. 2012). Esse sistema é usado por *X. citri* para evitar a predação por *Dictyostelium discoideum*, uma ameba de solo e a ativação deste ocorre durante a colonização epifítica da bactéria (Bayer-Santos et al. 2018, Ceseti et al. 2019). *Xanthomonas citri* pv. *tectonae* não possui o gene *tssJ* no cluster do T6SS, entretanto, o estudo de Choi et al. (2020) demonstra que a ausência do gene *tssJ* em um dos cluster de *X. oryzae* pv. *oryzae* não limita seu desempenho em contribuir para a virulência. A presença destes sistemas em *X. citri* pv. *tectonae* sugere a capacidade desta em realizar as atividades descritas acima, contudo o ideal é sempre realizar a confirmação por meio de ensaios funcionais.

O T3SS é um sistema especializado utilizado pelas bactérias invadir e colonizar os hospedeiros eucarióticos, secretando e translocando proteínas efetoras (Büttner e He 2009). Os efetores atuam em diversos processos celulares favorecendo crescimento da população bacteriana, expressão gênica, respostas de defesa e processos de sinalização (Kim et al. 2008, Lorenz et al. 2008, Raymond et al. 2013, Üstün et al. 2013, Teper et al. 2018). O efetoma de *X. citri* pv. *tectonae* é composto por 25 efetores. Dentre estes, o efetor XopAG é compartilhado apenas entre os isolados de teca e um isolado de feijão caupi. O efetor XopAG é relacionado com a indução de HR (resposta de hipersensibilidade) em toranja e laranja doce e sua ausência ou deleção leva a formação de sintomas de cancro cítrico (Escalon et al. 2013). Apesar de ter sido encontrado apenas nos isolados de teca e feijão caupi neste estudo, homólogos de XopAG são encontrados em *X. campestris* pv. *campestris* (Qian et al. 2005), *X. vesicatoria* (Potnis et al. 2011), *X. citri* pv. *bilvae* (Escalon et al. 2013) e *X. arboricola* (Roach et al. 2019). Gochez et al. (2015) encontrou um homólogo de XopAG, avrGf2 apenas no patótipo C de *X. citri* pv. *aurantifolii*, o qual é responsável pela indução de HR em toranja. No patótipo B o gene é danificado pela presença de um *transposon* e isso pode estar associado com a diferença quanto a gama de hospedeiros entre os patótipos. Efetores XopAG possuem um domínio que quando mutado, interrompe a elicitação de HR (Gochez et al. 2016). Os efetores XopE2 e XopE1 estão ausentes apenas nos isolados de teca. A expressão de XopE1 mediada por *Agrobacterium* em *Nicotiana benthamiana* levou à indução de morte celular (Thieme et al. 2007, Adlung et al. 2016) e este efetor mostrou-se relacionado com a manipulação da cascata de MAPK, uma importante rota de sinalização que se associa com as respostas de defesa e indução de HR (Teper et al. 2015). XopE2 induziu morte celular (HR) em *Solanum pseudocapsicum* (Thieme et al. 2007) e sua ausência reduziu a virulência um isolado de *X. vesicatoria*, demonstrando a capacidade do efetor em suprimir HR (Lin et al. 2011). XopE2 inibe a ativação de genes

relacionados com as respostas de defesa, induzidos por flg22, e inibe a deposição de calose em *Arabidopsis* spp. e contribui para o aumento dos sintomas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomatoe* atenuadas em tomate (Popov et al. 2016). O trabalho de Popov et al. (2016) sugere que *X. euvesicatoria* empregue boa parte de seu repertório para suprimir as respostas de defesa interferindo na sinalização tanto de forma seletiva quanto atuando em outros processos celulares. O efector XopF1 é ausente apenas nos isolados de *X. citri* pv. *tectonae* e nos isolados FDC 1561 e FDC 1566, enquanto o efector XopAD está ausente apenas no isolado CFBP 7111 além dos isolados de teca. A deleção de XopF1 não ocasionou diferenças na virulência de *X. vesicatoria* em pimentão, sugerindo que esse efector não possui um papel óbvio na interação (Büttner et al. 2007), mas Popov et al. (2016) demonstra a capacidade deste efector em inibir a ativação de gene envolvido com as respostas de defesa. *X. oryzae* pv. *oryzae* causa HR em *N. benthamiana* como resposta a interação de não hospedeiro e dentre os efetores envolvidos nessa resposta encontra-se XopF1 (Li et al. 2015). O efector XopAD está presente em todos os isolados de *Xanthomonas* causadoras de cancro cítrico (Moreira et al. 2010, Jalan et al. 2013a), mas a deleção de XopAD não foi capaz de alterar a gama de hospedeiro (Escalon et al. 2013).

O conjunto de efetores é variável entre as bactérias do gênero. Moreira et al. (2010) prediz um repertório de 27 efetores para as bactérias causadoras do cancro cítrico, enquanto Escalon et al. (2013) determina um conjunto de 26 efetores como *core* levando em consideração a comparação de 55 genomas de bactérias causadoras de cancro cítrico de todas as partes do mundo. Contudo, Jalan et al. (2013a) encontram 19 efetores em comum levando-se em consideração genomas de variantes do cancro cítrico. Fonseca et al. (2019) estudando os patótipos de *X. citri* causadoras do cancro cítrico e bactérias relacionada identificou a presença de quatro efetores presentes em todos os isolados estudados. Em nosso estudo, 10 efetores são comuns dentro da espécie, entretanto o número de genomas e os isolados diferem de um estudo

para o outro, além dos limites escolhidos para o limiar de ausência e presença, o que poderia explicar a diferença quanto ao conteúdo dos efetores *core*. O presente trabalho utilizou o limiar de 60 %, como feito por Fonseca et al. (2019).

Genes TAL não foram encontrados no genoma de *X. citri* pv. *tectonae*. Sequenciadores que geram *long reads* como o utilizado para o sequenciamento de UnB-Xtec2D facilitam a montagem dos genomas e dos efetores TAL (Peng et al. 2016). Os efetores TAL são proteínas que se ligam a sequências alvo no DNA do hospedeiro e após a ligação, induzem a transcrição do gene alvo ocasionando a doença para indivíduos suscetíveis ou elicitando respostas para os resistentes (Char et al. 2018). Em *Xanthomonas* causadoras do cancro cítrico, o efector TAL PthA é associado com os sintomas hipertróficos (Swarup et al. 1991). Ruh et al. (2017) demonstra isolados geneticamente distantes compartilhando genes para efetores TAL semelhantes, sugerindo que eventos de transferência horizontal possam ter ocorrido e contribuído para a adaptação ao feijoeiro. O número de genes TAL é variável no gênero (Schandry et al. 2018). *Xanthomonas oryzae* é abundante em genes TAL, outras espécies não ultrapassam quatro efetores TAL, mas há casos de *Xanthomonas* que não possuem nenhum TAL (Salzberg et al. 2008).

A recombinação é um dos principais processos que podem contribuir para a variabilidade e evolução de procariotos (Darmon et al. 2014, Dixit et al. 2017) e acontece em espécies de *Xanthomonas* (Gordon et al. 2015, Merda et al. 2017, Jibrin et al. 2018). Já se sabe o grande impacto que a recombinação pode exercer na evolução de uma espécie, como o caso de *X. perforans* (Timilsina et al. 2019b). O processo de recombinação pode ocorrer em um gene efector (Gordon et al. 2015), mas também levar à aquisição de efetores entre bactérias filogeneticamente próximas (Jibrin et al. 2018, Newberry et al. 2019). O presente trabalho demonstra sítios de recombinação em regiões com a presença de efetores, sugerindo uma

possível perda ou ganho nessas regiões, a que pode ter contribuído para a patogenicidade em teça.

Os isolados de *X. citri* pv. *tectonae* são possivelmente sensíveis a cobre, pois não possuem os genes relacionados a resistência. Os cluster *copLAB* e *copABCD*, responsáveis pela resistência estão presentes tipicamente em plasmídeos (Behlau et al. 2013, Behlau et al. 2020) e nenhum plasmídeo foi encontrado nos isolados sequenciados. Embora os genes de resistência a cobre estejam localizados principalmente em grandes plasmídeos, podem ser encontrados em cromossomos (Lee et al. 1994), porém a busca por meio de *blast* não localizou genes homólogos nos isolados deste estudo. Há ainda os isolados tolerantes a cobre (CuT), no qual não são considerados susceptíveis, pois toleram doses maiores que estes e nem resistentes, pois estes possuem os genes *cop*, não encontrados nos isolados tolerantes (Marin et al. 2019) e este trabalho demonstra que em isolados tolerantes ocorre a expressão de genes cromossomais homólogos como *cohA* e *cohB*. Os genes *coh* estão envolvidos com a homeostase ou metabolismo de cobre, sendo a homeostase presente em todas as bactérias e contribuindo para o correto balanço de cobre no interior da célula (Arguello et al. 2013). Os isolados deste estudo não apresentam genes de resistência a cobre, entretanto, a possibilidade de um futuro evento de conjugação e transferência destes genes não deve ser descartada, assim como o fenótipo tolerante, no qual são necessários ensaios de sensibilidade a cobre visando a confirmação do fenótipo. Assim, bactericidas formulados a base de cobre poderiam ser utilizados para o controle da mancha ocasionada por *X. citri* pv. *tectonae* em condições de viveiro.

6. CONCLUSÕES

- Vinte e seis isolados de *Xanthomonas* foram obtidos de folhas sintomáticas de teca de mudas provenientes de Mato Grosso e São Paulo;
- Os isolados de *Xanthomonas* da teca obtidos neste estudo não apresentaram diversidade genética e foram considerados assim, clonais. A baixa diversidade indica a possibilidade de ter havido um único evento de introdução no país ou *host jump*;
- Os genomas de dois isolados da coleção foram sequenciados por meio de duas tecnologias;
- Os isolados de teca, identificados em 2018 como *X. fuscans* foram analisados neste trabalho por mais de um método e pertencem à espécie *Xanthomonas citri*, sendo renomeados para *Xanthomonas citri* pv. *tectonae*;
- Os isolados de *Xanthomonas citri* pv. *tectonae* possuem um repertório com 23 efetores, diversos deles relacionados a resposta de hipersensibilidade (HR). Os efetores XopE1 e XopE2 estão presentes em todos os isolados, exceto nos isolados originários de teca;
- Os isolados de *Xanthomonas citri* pv. *tectonae* não apresentam o *operon* com genes de resistência a cobre, indicando a possibilidade de utilizar produtos a base deste composto no controle desta bactéria em condições de viveiro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abby SS, Cury J, Guglielmini J, Néron B, Touchon M, Rocha EPJSR (2016) Identification of protein secretion systems in bacterial genomes. 6: 1-14.

Abby SS, Néron B, Ménager H, Touchon M, Rocha EPJPO (2014) MacSyFinder: a program to mine genomes for molecular systems with an application to CRISPR-Cas systems. 9: e110726.

Abby SS, Rocha EP (2017) Identification of protein secretion systems in bacterial genomes using MacSyFinder. In.) Bacterial Protein Secretion Systems. Springer. pp. 1-21.

Abby SS, Rocha EPJPG (2012) The non-flagellar type III secretion system evolved from the bacterial flagellum and diversified into host-cell adapted systems. 8: e1002983.

Abrahamian P, Timilsina S, Minsavage GV, Kc S, Goss EM, Jones JB, Vallad GEJP (2018) The type III effector AvrBsT enhances *Xanthomonas perforans* fitness in field-grown tomato. 108: 1355-1362.

Adlung N, Prochaska H, Thieme S, Banik A, Blüher D, John P, Nagel O, Schulze S, Gantner J, Delker CJFIPS (2016) Non-host resistance induced by the *Xanthomonas* effector XopQ is widespread within the genus *Nicotiana* and functionally depends on EDS1. 7: 1796.

Adriko J, Mbega ER, Mortensen CN, Wulff EG, Tushemereirwe WK, Kubiriba J, Lund OSJEJOPP (2014) Improved PCR for identification of members of the genus *Xanthomonas*. 138: 293-306.

Afgan E, Baker D, Batut B, Van Den Beek M, Bouvier D, Čech M, Chilton J, Clements D, Coraor N, Grüning BaJNaR (2018) The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. 46: W537-W544.

Alič Š, Pédrón J, Dreó T, Van Gijsegem FJBG (2019) Genomic characterisation of the new *Dickeya fangzhongdai* species regrouping plant pathogens and environmental isolates. 20: 34.

- Andrews S, 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. In.: Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom.
- Araújo E, Costa J, Ferreira M, Quezado-Duval AJPP (2017) Widespread distribution of *Xanthomonas perforans* and limited presence of *X. gardneri* in Brazil. 66: 159-168.
- Arguedas MJDMCH (2011) Problemas fitosanitarios en teca (*Tectona grandis* LF) en América Central. 147.
- Arguello JM, Raimunda D, Padilla-Benavides TJFIC, Microbiology I (2013) Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. 3: 73.
- Arias SL, Block CC, Mayfield DA, Santillana G, Stulberg MJ, Broders KD, Jackson-Ziems TA, Munkvold GPJP (2020) Occurrence in Seeds and Potential Seed Transmission of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in Maize in the United States. PHYTO-08-19-0306-R.
- Aritua V, Harrison J, Sapp M, Buruchara R, Smith J, Studholme DJJFIM (2015) Genome sequencing reveals a new lineage associated with lablab bean and genetic exchange between *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. 6: 1080.
- Aritua V, Nanyonjo A, Kumakech F, Tushemereirwe WJaJOB (2007) Rep-PCR reveals a high genetic homogeneity among Ugandan isolates of *Xanthomonas campestris* pv *musacearum*. 6.
- Auch AF, Von Jan M, Klenk H-P, Göker MJSIGS (2010) Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. 2: 117-134.
- Babicki S, Arndt D, Marcu A, Liang Y, Grant JR, Maciejewski A, Wishart DSJNaR (2016) Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. 44: W147-W153.

Baptista JC, Machado MA, Homem RA, Torres PS, Vojnov AA, Amaral AMDJG, Biology M (2010) Mutation in the xpsD gene of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* affects cellulose degradation and virulence. 33: 146-153.

Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath PJS (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. 315: 1709-1712.

Basler Á, Pilhofer Á, Henderson G, Jensen G, Mekalanos JJN (2012) Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. 483: 182-186.

Basler M, Ho B, Mekalanos JJC (2013) Tit-for-tat: type VI secretion system counterattack during bacterial cell-cell interactions. 152: 884-894.

Bayer-Santos E, Lima LDP, Ceseti LDM, Ratagami CY, De Santana ES, Da Silva AM, Farah CS, Alvarez-Martinez CEJEM (2018) *Xanthomonas citri* T6SS mediates resistance to *Dictyostelium* predation and is regulated by an ECF σ factor and cognate Ser/Thr kinase. 20: 1562-1575.

Behlau F, Gochez AM, Jones JBJTPP (2020) Diversity and copper resistance of *Xanthomonas* affecting citrus. 1-13.

Behlau F, Hong JC, Jones JB, Graham JHJP (2013) Evidence for acquisition of copper resistance genes from different sources in citrus-associated xanthomonads. 103: 409-418.

Beth Mudgett MJaRPB (2005) New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. 56: 509-531.

Bezerra VFG, Ishida AKN, Cardoso SVD, De Oliveira LC. Caracterização de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Proceedings of the Embrapa Amazônia Oriental- Artigo em anais de congresso (ALICE), 2017*: In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, 21

Binnewies TT, Motro Y, Hallin PF, Lund O, Dunn D, La T, Hampson DJ, Bellgard M, Wassenaar TM, Ussery DWJF, Genomics I (2006) Ten years of bacterial genome sequencing: comparative-genomics-based discoveries. 6: 165-185.

Bogdanove AJ, Koebnik R, Lu H, Furutani A, Angiuoli SV, Patil PB, Van Sluys M-A, Ryan RP, Meyer DF, Han S-WJJOB (2011) Two new complete genome sequences offer insight into host and tissue specificity of plant pathogenic *Xanthomonas* spp. 193: 5450-5464.

Boiteux L, Fonseca M, Simon PJJOTaSFHS (1999) Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot. 124: 32-38.

Bonaldo SM, Barceli AC, Trento RA, Gasparotto F, Taffarel CJSP (2011) Relato oficial da ocorrência de *Olivea tectonea* em teca (*Tectona grandis*) no Brasil. 37: 153-153.

Bophela K, Venter S, Wingfield M, Duran A, Tarigan M, Coutinho TJaPP (2019) *Xanthomonas perforans*: a tomato and pepper pathogen associated with bacterial blight and dieback of *Eucalyptus pellita* seedlings in Indonesia. 48: 543-551.

Borges R, Fontes M, Macedo MaD, Lima M, Boiteux L, Fonseca MJPD (2019a) First Report of *Tomato Chlorosis Virus* Infecting *Tectona grandis* Associated With Infestation of *Bemisia tabaci* Mediterranean in Central Brazil. 103: 2704.

Borges R, Rossato M, Santos M, Ferreira M, Fonseca M, Reis A, Boiteux LJP (2018a) First Report of a Leaf Spot Caused by *Paramyothecium roridum* on *Tectona grandis* in Brazil. 102: 1661-1661.

Borges R, Santos M, Macedo M, Martins I, Nascimento A, Boiteux L, Fonseca M, Mello SJNDR (2014) First report of a wilt disease of *Tectona grandis* caused by *Thielaviopsis basicola* in Brazil. 30: 17-17.

Borges R, Santos M, Macedo M, Martins I, Nascimento A, Café Filho A, Boiteux L, Fonseca M, Inácio C, De Mello S. A trunk canker disease of *Tectona grandis* induced by

Lasiodiplodia theobromae in Brazil. *Proceedings of the Embrapa Hortaliças-Artigo em anais de congresso (ALICE)*, 2015: New Disease Reports, v. 31, p. 26, Jan./Jun. 2015.

Borges RC, Macedo MA, Cabral CS, Rossato M, Fontes MG, Santos MD, Ferreira MA, Fonseca ME, Reis A, Boiteux LSJEH-aEPI (2018b) Vascular wilt of teak (*Tectona grandis*) caused by *Fusarium oxysporum* in Brazil.

Borges RC, Rossato M, Albuquerque GMR, Ferreira MA, Brasileiro AC, Fonseca MEN, Boiteux LSJJOPP (2019b) Crown gall caused by *Agrobacterium tumefaciens* species complex: a novel nursery disease of *Tectona grandis* in Brazil. 101: 445-445.

Borges RC, Rossato M, Maria Do Desterro MS, Cabral CS, Albuquerque GMR, Ferreira MA, Fonseca MEN, Boiteux LS (2018c) A leaf spot of *Tectona grandis* caused by *Xanthomonas fuscans* in Brazil. *Journal of Plant Pathology*: 1-1.

Boudon S, Manceau C, Nottéghem J-LJP (2005) Structure and origin of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* populations causing bacterial spot of stone fruit trees in Western Europe. 95: 1081-1088.

Brunings AM, Gabriel DWJMPP (2003) *Xanthomonas citri*: breaking the surface. 4: 141-157.

Burdman S, Bahar O, Parker JK, De La Fuente LJG (2011) Involvement of type IV pili in pathogenicity of plant pathogenic bacteria. 2: 706-735.

Büttner D, He SYJPP (2009) Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. 150: 1656-1664.

Büttner D, Noël L, Stuttmann J, Bonas UJMP-MI (2007) Characterization of the nonconserved hpaB-hrpF region in the hrp pathogenicity island from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. 20: 1063-1074.

Cabral P, Capucho A, Pereira O, Maciel-Zambolim E, Freitas R, Zambolim LJAPDN (2010) First report of teak leaf rust disease caused by *Olivea tectonae* in Brazil. 5: 113-114.

- Canteros BI, Minsavage GV, Jones JB, Stall REJP (1995) Diversity of plasmids in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. 85: 1482-1486.
- Cantino P, Harley R, Wagstaff SJaILS (1992) Genera of Labiatae: status and classification. 11: 511-522.
- Cao Z, Casabona MG, Kneuper H, Chalmers JD, Palmer TJNM (2017) The type VII secretion system of *Staphylococcus aureus* secretes a nuclease toxin that targets competitor bacteria. 2: 16183.
- Cascales E, Christie PJJNRM (2003) The versatile bacterial type IV secretion systems. 1: 137-149.
- Cascales E, Christie PJJS (2004) Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate. 304: 1170-1173.
- Ceseti LM, De Santana ES, Ratagami CY, Barreiros Y, Lima LDP, Dunger G, Farah CS, Alvarez-Martinez CEJCM (2019) The *Xanthomonas citri* pv. *citri* Type VI Secretion System is Induced During Epiphytic Colonization of Citrus. 76: 1105-1111.
- Char SN, Park S, Yang B (2018) Interaction of rice and *Xanthomonas* TAL effectors. In.) Rice Genomics, Genetics and Breeding. Springer. pp. 375-391.
- Cho H, Song E-S, Heu S, Lee YK, Lee S, Lee S-W, Baek J, Park DS, Lee T-H, Kim J-GJFIM (2019) Prediction of host-specific genes by pan-genome analyses of the Korean *Ralstonia solanacearum* species complex. 10: 506.
- Choi Y, Kim N, Manna M, Kim H, Park J, Jung H, Han G, Lee H-H, Seo Y-SJTTPPJ (2020) Characterization of Type VI Secretion System in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and Its Role in Virulence to Rice. 36: 289.
- Chun J, Rainey FaJIJOS, Microbiology E (2014) Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. 64: 316-324.

Constantin E, Cleenwerck I, Maes M, Baeyen S, Van Malderghem C, De Vos P, Cottyn BJPP (2016) Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. 65: 792-806.

Cook A, Stall RJPDR (1969) Differentiation of pathotypes among isolates of *Xanthomonas vesicatoria*.

Corbett M, Virtue S, Bell K, Birch P, Burr T, Hyman L, Lilley K, Pooch S, Toth I, Salmond GJMP-MI (2005) Identification of a new quorum-sensing-controlled virulence factor in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* secreted via the type II targeting pathway. 18: 334-342.

Cornelis GR, Van Gijsegem FJaRIM (2000) Assembly and function of type III secretory systems. 54: 735-774.

Coutinho T, Preisig O, Mergaert J, Cnockaert M, Riedel K-H, Swings J, Wingfield MJPD (2002) Bacterial blight and dieback of *Eucalyptus* species, hybrids, and clones in South Africa. 86: 20-25.

Coutinho T, Van Der Westhuizen L, Roux J, Mcfarlane S, Venter SJPP (2015) Significant host jump of *Xanthomonas vasicola* from sugarcane to a *Eucalyptus grandis* clone in South Africa. 64: 576-581.

Croucher NJ, Page AJ, Connor TR, Delaney AJ, Keane JA, Bentley SD, Parkhill J, Harris SRJNaR (2015) Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. 43: e15-e15.

Da Silva AR, Ferro JA, Reinach F, Farah C, Furlan L, Quaggio R, Monteiro-Vitorello C, Van Sluys M, Almeida NA, Alves LJM (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. 417: 459-463.

- Daly A, Shivas R, Pegg G, Mackie AJaPDN (2006) First record of teak leaf rust (*Olivea tectoniae*) in Australia. 1: 25-26.
- Darmon E, Leach DRJM, Reviews MB (2014) Bacterial genome instability. 78: 1-39.
- Darrasse A, Barret M, Cesbron S, Compant S, Jacques M-aJP, Soil (2018) Niches and routes of transmission of *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* to bean seeds. 422: 115-128.
- Darrasse A, Carrere S, Barbe V, Boureau T, Arrieta-Ortiz ML, Bonneau S, Briand M, Brin C, Cociancich S, Durand KJBG (2013) Genome sequence of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* strain 4834-R reveals that flagellar motility is not a general feature of xanthomonads. 14: 761.
- De Araújo Filho J, Machado A, De Faria R, Camargo LJPD (2012) Root-Knot Disease Caused by *Meloidogyne arenaria* and *M. javanica* in Teak in São Paulo State, Brazil. 96: 151-151.
- De Vos P (2011) Multilocus sequence determination and analysis. In.) Methods in microbiology. Elsevier. pp. 385-407.
- Delepelaire PJBEBa-MCR (2004) Type I secretion in gram-negative bacteria. 1694: 149-161.
- Desvaux M, Parham NJ, Henderson IRJCIIMB (2004) Type V protein secretion: simplicity gone awry? 6: 111-124.
- Dixit PD, Pang TY, Maslov SJG (2017) Recombination-driven genome evolution and stability of bacterial species. 207: 281-295.
- Dos Santos A, Inácio C, Auer C, Lemes G. Ocorrência de *Olivea tectoniae* em folhas de *Tectona grandis* no Estado do Tocantins, Brasil. *Proceedings of the Embrapa Florestas-Resumo em anais de congresso (ALICE), 2011: Tropical Plant Pathology, Brasília, DF, v. 36, p. 1190, 2011. 1 CD-ROM*

Dos Santos ÍTBF, Pinheiro HSS, Da Silva SS, De Santana LKN, Santos TS, Dos Santos VB, Mesquita JB, Ribeiro GTJRCDA (2018) Queima de folhas em *Tectona grandis* Linn. F. causadas por *Phomopsis* sp. em Sergipe. 3: 6606.

Dotaniya M, Meena V, Lata M, Meena HJK (2013) Teak plantation-a potential source of income generation. 1: 61-63.

Dowson DJZFB, Parasitenkunde Und Infektionskrankheiten, 2 (1939) On the systematic position and generic names of the Gram negative bacterial plant pathogens. 100: 177-193.

Dunger G, Guzzo CR, Andrade MO, Jones JB, Farah CSJMP-MI (2014) *Xanthomonas citri* subsp. *citri* type IV pilus is required for twitching motility, biofilm development, and adherence. 27: 1132-1147.

Dunger G, Llontop E, Guzzo CR, Farah CSJCOIM (2016) The *Xanthomonas* type IV pilus. 30: 88-97.

Dutra MR, Campos VP, Macedo RLG, Venturin NJRCEDEF, Garça (2006) Ocorrência e hospedabilidade de nematóides em mudas de *Tectona grandis* Lf (Teca).

Dye D, Bradbury J, Goto M, Hayward A, Lelliott R, Schroth MJROPP (1980) International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. 59: 153-168.

Escalon A, Javegny S, Vernière C, Noël LD, Vital K, Poussier S, Hajri A, Boureau T, Pruvost O, Arlat MJMPP (2013) Variations in type III effector repertoires, pathological phenotypes and host range of *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotypes. 14: 483-496.

Feil H, Feil WS, Chain P, Larimer F, Dibartolo G, Copeland A, Lykidis A, Trong S, Nolan M, Goltsman EJPOTNaOS (2005) Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000. 102: 11064-11069.

Ferraz HGM, Badel JL, Da Silva Guimarães LM, Reis BP, Tótola MR, Gonçalves RC, Alfenas ACJTTPJ (2018) *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalyptorum* pv. nov. causing bacterial leaf blight on eucalypt in Brazil. 34: 269.

Ferreira MA, Alfenas AC, Mafia RGJPFDEPN (2013) *Ceratocystis fimbriata* em espécies florestais e agronômicas no Brasil. 1: 75-101.

Ferreira MA, Bonneau S, Briand M, Cesbron S, Portier P, Darrasse A, Gama MA, Barbosa MaG, Mariano RDLR, Souza EBDJFIPS (2019) *Xanthomonas citri* pv. *viticola* affecting grapevine in Brazil: emergence of a successful monomorphic pathogen. 10: 489.

Figueiredo E, De Sa CJEa-D (2015) Silvicultura e manejo de povoamentos de Teca (*Tectona grandis* Lf).

Firmino AC, Tozze Jr H, Furtado ELJNDR (2012) First report of *Ceratocystis fimbriata* causing wilt in *Tectona grandis* in Brazil. 25: 2044-0588.2012.

Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb J-F, Dougherty BA, Merrick JMJS (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. 269: 496-512.

Florestal CJDELHWCCBMDCDT-CFP, 2006. Manual do cultivo da teca. In.

Fonseca NP, Patané JS, Varani AM, Felestrino ÉB, Caneschi WL, Sanchez AB, Cordeiro IF, Lemes CGDC, Assis RDaB, Garcia CCMJFIM (2019) Analyses of seven new genomes of *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* strains, causative agents of citrus canker B and C, show a reduced repertoire of pathogenicity-related genes. 10: 2361.

Fournier P-E, Drancourt M, Raoult DJTLID (2007) Bacterial genome sequencing and its use in infectious diseases. 7: 711-723.

Fraser CM, Gocayne JD, White O, Adams MD, Clayton RA, Fleischmann RD, Bult CJ, Kerlavage AR, Sutton G, Kelley JMJS (1995) The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. 270: 397-404.

Gabriel D, Kingsley M, Hunter J, Gottwald TJIJOS, Microbiology E (1989) Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) to species and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains. 39: 14-22.

Gasparotto L, Pereira JJEaO-CT (2013) A ferrugem da teca no Estado do Amazonas.

Gillis M, Vandamme P, De Vos P, Swings J, Kersters K (2001) Polyphasic taxonomy. In.) Bergey's Manual® of systematic bacteriology. Springer. pp. 43-48.

Glaeser SP, Kämpfer PJS, Microbiology A (2015) Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. 38: 237-245.

Gochez AM, Minsavage GV, Potnis N, Canteros BI, Stall RE, Jones JBJPP (2015) A functional Xop AG homologue in *Xanthomonas fuscans* pv. *aurantifolii* strain C limits host range. 64: 1207-1214.

Gochez AM, Shantharaj D, Potnis N, Zhou X, Minsavage GV, White FF, Wang N, Hurlbert JC, Jones JBJMPP (2016) Molecular characterization of XopAG effector AvrGf2 from *Xanthomonas fuscans* ssp. *aurantifolii* in grapefruit♣. 18: 405-419.

Gonçalves RC, Douglas L, Oliveira JR, Maffia LA, Cascardo J, Alfenas ACJTTPP (2008) Etiology of bacterial leaf blight of eucalyptus in Brazil. 33: 180-188.

Gordon JL, Lefeuvre P, Escalon A, Barbe V, Cruveiller S, Gagnevin L, Pruvost OJBG (2015) Comparative genomics of 43 strains of *Xanthomonas citri* pv. *citri* reveals the evolutionary events giving rise to pathotypes with different host ranges. 16: 1098.

- Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JMJIJOS, Microbiology E (2007) DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. 57: 81-91.
- Granato LM, Picchi SC, De Oliveira Andrade M, Takita MA, De Souza AA, Wang N, Machado MaJBM (2016) The ATP-dependent RNA helicase HrpB plays an important role in motility and biofilm formation in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. 16: 55.
- Grau J, Reschke M, Erkes A, Streubel J, Morgan RD, Wilson GG, Koebnik R, Boch JJSR (2016) AnnoTALE: bioinformatics tools for identification, annotation, and nomenclature of TALEs from *Xanthomonas* genomic sequences. 6: 21077.
- Green ER, Meccas JJVMOBP (2016) Bacterial secretion systems: an overview. 213-239.
- Grissa I, Vergnaud G, Pourcel CJNaR (2007) CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. 35: W52-W57.
- Guglielmini J, Néron B, Abby SS, Garcillán-Barcia MP, La Cruz FD, Rocha EPJNaR (2014) Key components of the eight classes of type IV secretion systems involved in bacterial conjugation or protein secretion. 42: 5715-5727.
- Hadfield J, Croucher NJ, Goater RJ, Abudahab K, Aanensen DM, Harris SRJB (2018) Phandango: an interactive viewer for bacterial population genomics. 34: 292-293.
- Hager AJ, Bolton DL, Pelletier MR, Brittnacher MJ, Gallagher LA, Kaul R, Skerrett SJ, Miller SI, Guina TJMM (2006) Type IV pili-mediated secretion modulates *Francisella* virulence. 62: 227-237.
- Hajri A, Brin C, Hunault G, Lardeux F, Lemaire C, Manceau C, Boureau T, Poussier SJPO (2009) A «repertoire for repertoire» hypothesis: Repertoires of type three effectors are candidate determinants of host specificity in *Xanthomonas*. 4.

Hayes CS, Aoki SK, Low DaJaROG (2010) Bacterial contact-dependent delivery systems. 44: 71-90.

Heras J, Domínguez C, Mata E, Pascual V, Lozano C, Torres C, Zarazaga MJBIB (2016) A survey of tools for analysing DNA fingerprints. 17: 903-911.

Hersemann L, Wibberg D, Blom J, Goesmann A, Widmer F, Vorhölter F-J, Kölliker RJBG (2017) Comparative genomics of host adaptive traits in *Xanthomonas translucens* pv. *graminis*. 18: 35.

Horvath P, Barrangou RJS (2010) CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. 327: 167-170.

Huang S, Li Z, Wei J, Mo J, Li Q, Guo T, Luo J, Yang X, Tan X, Yang XJPD (2017) First report of stem canker caused by *Fusarium solani* on *Tectona grandis* in China. 101: 2148-2148.

Huelsenbeck JP, Ronquist FJB (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. 17: 754-755.

Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata AJJOB (1987) Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. 169: 5429-5433.

Islam MS, Akter MM, Rahman MA, Rahman MM, Akhtar MM, Alam MFJCRB (2010) Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* strains from crown gall sample of dicot plants in Bangladesh. 3: 27-36.

Ismail B, Anggraeni IJJPTH (2008) Disease Identification in Teak (*Tectona Grandis*) and Acacia (*Acacia Auriculiformis*) in Community Forest of Wonogiri District Central Java. 2: 149-162.

- Ivanović Ž, Popović T, Janse J, Kojić M, Stanković S, Gavrilović V, Fira DJEJOPP (2015) Molecular assessment of genetic diversity of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* strains from Serbia by various DNA fingerprinting techniques. 141: 133-145.
- Jain C, Rodriguez-R LM, Phillippy AM, Konstantinidis KT, Aluru SJNC (2018) High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. 9: 1-8.
- Jalan N, Kumar D, Andrade MO, Yu F, Jones JB, Graham JH, White FF, Setubal JC, Wang NJBG (2013a) Comparative genomic and transcriptome analyses of pathotypes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* provide insights into mechanisms of bacterial virulence and host range. 14: 551.
- Jalan N, Kumar D, Yu F, Jones JB, Graham JH, Wang NJGA (2013b) Complete genome sequence of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strain Aw12879, a restricted-host-range citrus canker-causing bacterium. 1.
- Janda JM, Abbott SLJJOCM (2007) 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. 45: 2761-2764.
- Jarrell KF, McBride MJJNRM (2008) The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. 6: 466-476.
- Jensen BD, Vicente JG, Manandhar HK, Roberts SJJPD (2010) Occurrence and diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in vegetable Brassica fields in Nepal. 94: 298-305.
- Jibrin MO, Potnis N, Timilsina S, Minsavage GV, Vallad GE, Roberts PD, Jones JB, Goss EMJA, Microbiology E (2018) Genomic inference of recombination-mediated evolution in *Xanthomonas euvesicatoria* and *X. perforans*. 84.
- Johnson J, Chen J-SJFMR (1995) Taxonomic relationships among strains of *Clostridium acetobutylicum* and other phenotypically similar organisms. 17: 233-240.

- Jones JB, Lacy GH, Bouzar H, Stall RE, Schaad NW (2004) Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper.
- Kang Y, Huang J, Mao G, He L-Y, Schell MJMP-MI (1994) Dramatically reduced virulence of mutants of *Pseudomonas solanacearum* defective in export of extracellular proteins across the outer membrane. 7: 370-377.
- Kaosa-Ard AJNHBSS (1981) Teak (*Tectona grandis* Linn. f) its natural distribution and related factors. 29: 55-74.
- Kaster A-K, 2020. Leibniz Institute DSMZ–German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. In.: Germany.
- Katzen F, Ferreira DU, Oddo CG, Ielmini MV, Becker A, Pühler A, Ielpi LJJOB (1998) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. 180: 1607-1617.
- Kaur A, Bansal K, Kumar S, Sonti RV, Patil PBJaM (2019) Complete genome dynamics of a dominant-lineage strain of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* harbouring a novel plasmid encoding a type IV secretion system. 1: e000063.
- Kay S, Hahn S, Marois E, Hause G, Bonas UJS (2007) A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. 318: 648-651.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran CJB (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. 28: 1647-1649.
- Kim J-G, Taylor KW, Hotson A, Keegan M, Schmelz EA, Mudgett MBJTPC (2008) XopD SUMO protease affects host transcription, promotes pathogen growth, and delays symptom development in *Xanthomonas*-infected tomato leaves. 20: 1915-1929.

Kollert W, Kleine M (2018) global teak study: analysis, evaluation and future potential of teak resources. IUFRO

Koren S, Walenz BP, Berlin K, Miller JR, Bergman NH, Phillippy AMJGR (2017) Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. 27: 722-736.

Krieg NRJCOM (1988) Bacterial classification: an overview. 34: 536-540.

Land M, Hauser L, Jun S-R, Nookaew I, Leuze MR, Ahn T-H, Karpinets T, Lund O, Kora G, Wassenaar TJF, Genomics I (2015) Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. 15: 141-161.

Lee B-M, Park Y-J, Park D-S, Kang H-W, Kim J-G, Song E-S, Park I-C, Yoon U-H, Hahn J-H, Koo B-SJNaR (2005) The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. 33: 577-586.

Lee SJNZJOFS (2003) Pathology of tropical hardwood plantations in South-East Asia. 33: 321-335.

Lee Y, Henderson M, Panopoulos N, Schroth MJJOB (1994) Molecular cloning, chromosomal mapping, and sequence analysis of copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*: homology with small blue copper proteins and multicopper oxidase. 176: 173-188.

Lee YH, Lee S, Lee DH, Ji SH, Chang HY, Heu S, Hyun JW, Ra D-S, Park EWJEJOPP (2008) Differentiation of citrus bacterial canker strains in Korea by host range, rep-PCR fingerprinting and 16S rDNA analysis. 121: 97-102.

Leyns F, De Cleene M, Swings J-G, De Ley JJTBR (1984) The host range of the genus *Xanthomonas*. 50: 308-356.

Li B, Olmstead RGJP (2017) Two new subfamilies in Lamiaceae. 313: 222-226.

Li S, Wang Y, Wang S, Fang A, Wang J, Liu L, Zhang K, Mao Y, Sun WJMP-MI (2015) The type III effector AvrBs2 in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* suppresses rice immunity and promotes disease development. 28: 869-880.

Li Y, Hao G, Galvani CD, Meng Y, Fuente LDL, Hoch H, Burr TJJM (2007) Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation and cell-cell aggregation. 153: 719-726.

Lin R-H, Peng C-W, Lin Y-C, Peng H-L, Huang H-CJBS (2011) The XopE2 effector protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is involved in virulence and in the suppression of the hypersensitive response. 52.

Lopez J, Feldman MFJJOBC (2018) Expanding the molecular weaponry of bacterial species. 293: 1515-1516.

López MM, Lopez-Soriano P, Garita-Cambronero J, Beltrán C, Taghouti G, Portier P, Cubero J, Fischer-Le Saux M, Marco-Noales EJJIOS, Microbiology E (2018) *Xanthomonas prunicola* sp. nov., a novel pathogen that affects nectarine (*Prunus persica* var. *nectarina*) trees. 68: 1857-1866.

Lorenz C, Schulz S, Wolsch T, Rossier O, Bonas U, Büttner DJPP (2008) HpaC controls substrate specificity of the *Xanthomonas* type III secretion system. 4: e1000094.

Marin T, Galvanin A, Lanza F, Behlau FJPP (2019) Description of copper tolerant *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and genotypic comparison with sensitive and resistant strains. 68: 1088-1098.

Marques M, Jesus J, Virtuoso M, Marques V, Santos GJRVDaEDS (2015) Relato de ocorrência da ferrugem da teca, causada por *Olivea neotectonae* no Estado de Goiás.

Mendonça L, Zambolim L, Badel JJJOB, Access MO (2017) Bacterial citrus diseases: Major threats and recent progress. 5: 4-2017.

Merda D, Briand M, Bosis E, Rousseau C, Portier P, Barret M, Jacques MA, Fischer-Le Saux MJME (2017) Ancestral acquisitions, gene flow and multiple evolutionary trajectories of the type three secretion system and effectors in *Xanthomonas* plant pathogens. 26: 5939-5952.

Mesquita JB, Santos ÍTBFD, Ribeiro GT, Santos MJCDJSP (2016) Ocorrência de ferrugem (*Olivea neotectonae*) em plantas de teca no estado de Sergipe. 42: 278-279.

Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Proceedings of the 2010 gateway computing environments workshop (GCE), 2010*: Ieee, 1-8.

Miranda I, Sousa V, Pereira HJJOWS (2011) Wood properties of teak (*Tectona grandis*) from a mature unmanaged stand in East Timor. 57: 171-178.

Mohanan CJJOF (2009) Bacterial diseases of teak (*Tectona grandis* Lf) in forest nurseries and plantations in Kerala and their management. 32: 131-136.

Mohd Farid A, Lee S, Maziah Z, Rosli H, Norwati MJMJOM (2005) Basal Root Rot, a new Disease of Teak (*Tectona grandis*) in Malaysia caused by *Phellinus noxius*. 1: 40-45.

Mojica FJ, García-Martínez J, Soria EJJOME (2005) Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. 60: 174-182.

Monteiro-Vitorello CB, Camargo LE, Van Sluys MA, Kitajima JP, Truffi D, Do Amaral AM, Harakava R, De Oliveira JC, Wood D, De Oliveira MCJMP-MI (2004) The genome sequence of the gram-positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. 17: 827-836.

Moreira LM, Almeida NF, Potnis N, Digiampietri LA, Adi SS, Bortolossi JC, Da Silva AC, Da Silva AM, De Moraes FE, De Oliveira JCJBG (2010) Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. 11: 238.

Morinière L, Burlet A, Rosenthal ER, Nesme X, Portier P, Bull CT, Lavire C, Fischer-Le Saux M, Bertolla FJS, Microbiology A (2020) Clarifying the taxonomy of the causal agent of bacterial leaf spot of lettuce through a polyphasic approach leads to combine *Xanthomonas hortorum* Vauterin et al. 1995 and *Xanthomonas cynarae* Trébaol 2000 emend. Timilsina et al. 2019. 126087.

Nair K (1988) The teak defoliator in Kerala, India. In.) Dynamics of forest insect populations. Springer. pp. 267-289.

Ndungo V, Eden-Green S, Blomme G, Crozier J, Smith JJPP (2006) Presence of banana *Xanthomonas* wilt (*Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*) in the Democratic Republic of Congo (DRC). 55: 294-294.

Newberry E, Bhandari R, Minsavage G, Timilsina S, Jibrin M, Kemble J, Sikora E, Jones J, Potnis NJB (2019) Recently emerged and diverse lineages of *Xanthomonas perforans* have independently evolved through plasmid acquisition and homologous recombination originating from multiple *Xanthomonas* species. 681619.

Ngoc LBT, Verniere C, Jouen E, Ah-You N, Lefeuvre P, Chiroleu F, Gagnevin L, Pruvost OJJOS, Microbiology E (2010) Amplified fragment length polymorphism and multilocus sequence analysis-based genotypic relatedness among pathogenic variants of *Xanthomonas citri* pv. *citri* and *Xanthomonas campestris* pv. *bilvae*. 60: 515-525.

Niu X-N, Wei Z-Q, Zou H-F, Xie G-G, Wu F, Li K-J, Jiang W, Tang J-L, He Y-QJBM (2015) Complete sequence and detailed analysis of the first indigenous plasmid from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. 15: 1-15.

Nivaskumar M, Francetic OJBEBa-MCR (2014) Type II secretion system: a magic beanstalk or a protein escalator. 1843: 1568-1577.

Ntambo MS, Meng JY, Rott P, Royer M, Lin LH, Zhang HL, Gao SJJPP (2019) Identification and characterization of *Xanthomonas albilineans* causing sugarcane leaf scald in China using multilocus sequence analysis. 68: 269-277.

Nunney L, Schuenzel EL, Scally M, Bromley RE, Stouthamer RJA, Microbiology E (2014) Large-scale intersubspecific recombination in the plant-pathogenic bacterium *Xylella fastidiosa* is associated with the host shift to mulberry. 80: 3025-3033.

Nylander JJaFTA, Website: [Http://Www. Ebc. Uu. Se/Systzoo/Staff/Nylander. Html](http://www.ebc.uu.se/Systzoo/Staff/Nylander.html) (2002) MrModeltest, version 1.1 b.

Odipto J, Tusiime G, Tripathi L, Aritua VJaJOB (2009) Genetic homogeneity among Ugandan isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* revealed by randomly amplified polymorphic DNA analysis. 8.

Okechukwu R, Ekpo E, Okechukwu OJaJOaR (2010) Seed to plant transmission of *Xanthomonas campestris* pv. *vignicola* isolates in cowpea.

Oliveira ASD, Silva RaDJCF (2013) Ocorrência e patogenicidade de *Meloidogyne javanica* sobre plantas de teca (*Tectona grandis* Linn. F.). 23: 563-569.

Orwa C, Mutua A, Kindt R, Jamnadass R, Simons AJaDaTR, 4. SGV (2009) Agroforestry Database: a tree reference and selection guide. Version 4.

Osdaghi E, Taghavi SM, Hamzehzarghani H, Fazliarab A, Lamichhane JRJPP (2017) Monitoring the occurrence of tomato bacterial spot and range of the causal agent *Xanthomonas perforans* in Iran. 66: 990-1002.

Paiva B, Wendland A, Borba T, Araujo LJEaEF-aEPI (2018) Molecular characterization and differential interaction of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* with common beans (*Phaseolus vulgaris*).

Pandey D, Brown CJU-F- (2000) Teak: a global overview. 3-13.

Patel JBJMD (2001) 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. 6: 313-321.

Patel M, Kulkarni Y, Dhande GJCS (1952) Some new bacterial diseases of plants. 21: 345-346.

Pédron J, Mondy S, Des Essarts YR, Van Gijsegem F, Faure DJBG (2014) Genomic and metabolic comparison with *Dickeya dadantii* 3937 reveals the emerging *Dickeya solani* potato pathogen to display distinctive metabolic activities and T5SS/T6SS-related toxin repertoire. 15: 283.

Peng Z, Hu Y, Xie J, Potnis N, Akhunova A, Jones J, Liu Z, White FF, Liu SJBG (2016) Long read and single molecule DNA sequencing simplifies genome assembly and TAL effector gene analysis of *Xanthomonas translucens*. 17: 21.

Pereira UP, Gouran H, Nascimento R, Adaskaveg JE, Goulart LR, Dandekar AMJGA (2015) Complete Genome Sequence of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* 417, a Copper-Resistant Strain Isolated from *Juglans regia* L. 3.

Pieretti I, Cociancich S, Bolot S, Carrère S, Morisset A, Rott P, Royer MJG (2015) Full genome sequence analysis of two isolates reveals a novel *Xanthomonas* species close to the sugarcane pathogen *Xanthomonas albilineans*. 6: 714-733.

Pieretti I, Royer M, Barbe V, Carrere S, Koebnik R, Cociancich S, Couloux A, Darrasse A, Gouzy J, Jacques M-aJBG (2009) The complete genome sequence of *Xanthomonas albilineans* provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited Xanthomonadaceae. 10: 616.

Pieretti I, Royer M, Barbe V, Carrere S, Koebnik R, Couloux A, Darrasse A, Gouzy J, Jacques M-A, Lauber EJBG (2012) Genomic insights into strategies used by *Xanthomonas albilineans* with its reduced artillery to spread within sugarcane xylem vessels. 13: 658.

Pieri C, Passador M, Furtado E, Carvalho Junior AJSP (2011) Novas observações sobre a ocorrência da ferrugem da teca (*Tectona grandis*) no Brasil e revisão taxonômica do patógeno. 37: 199-201.

Plazas M, De Rossi R, Brücher E, Guerra F, Vilaró M, Guerra G, Wu G, Ortiz-Castro M, Broders KJPD (2018) First report of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* causing bacteria leaf streak of maize (*Zea mays*) in Argentina. 102: 1026-1026.

Poltronieri LS, Verzignassi JR, Benchimol RLJSP (2008) *Tectona grandis*, nova hospedeira de *Rhizoctonia solani* no Pará. 34: 291-291.

Popov G, Fraiture M, Brunner F, Sessa GJMP-MI (2016) Multiple *Xanthomonas euvesicatoria* type III effectors inhibit flg22-triggered immunity. 29: 651-660.

Potnis N, Krasileva K, Chow V, Almeida NF, Patil PB, Ryan RP, Sharlach M, Behlau F, Dow JM, Momol MJBG (2011) Comparative genomics reveals diversity among xanthomonads infecting tomato and pepper. 12: 146.

Pruvost O, Boyer C, Vital K, Gagnevin L, De Bruno Austin L, Rey J-Y (2011) First report in Ghana of *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* causing mango bacterial canker on *Mangifera indica*.

Qian W, Jia Y, Ren S-X, He Y-Q, Feng J-X, Lu L-F, Sun Q, Ying G, Tang D-J, Tang HJGR (2005) Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. 15: 757-767.

Rademaker J, Hoste B, Louws FJ, Kersters K, Swings J, Vauterin L, Vauterin P, De Bruijn FJJIOS, Microbiology E (2000) Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. 50: 665-677.

Raghavendra B, Singh D, Yadava D, Mondal KK, Sharma PJaOP, Protection P (2013) Virulence analysis and genetic diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causing black rot of crucifers. 46: 227-242.

Raymond B, Young JC, Pallett M, Endres RG, Clements A, Frankel GJTIM (2013) Subversion of trafficking, apoptosis, and innate immunity by type III secretion system effectors. 21: 430-441.

Richard D, Boyer C, Vernière C, Canteros BI, Lefeuvre P, Pruvost OJGA (2017) Complete genome sequences of six copper-resistant *Xanthomonas citri* pv. *citri* strains causing Asiatic citrus canker, obtained using long-read technology. 5.

Richter M, Rosselló-Móra RJPOTNaOS (2009) Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. 106: 19126-19131.

Roach R, Mann R, Gambley C, Chapman T, Shivas R, Rodoni BJBG (2019) Genomic sequence analysis reveals diversity of Australian *Xanthomonas* species associated with bacterial leaf spot of tomato, capsicum and chilli. 20: 310.

Robbs C, Da Ponte J, Sales MDGJFB (1978) Note on *Xanthomonas mangiferaeindicae* in Northeast Brazil. 3: 215-218.

Rondon M, Bonaldo S, Bahia JaDISFDS (2009) Ocorrência de antracnose em mudas de teca (*Tectona grandis*) no estado de Mato Grosso. 121-124.

Rostøl JT, Marraffini LJCH, Microbe (2019) (Ph) ighting phages: how bacteria resist their parasites. 25: 184-194.

Rott P, Soupa D, Brunet Y, Feldmann P, Letourmy PJPP (1995) Leaf scald (*Xanthomonas albilineans*) incidence and its effect on yield in seven sugarcane cultivars in Guadeloupe. 44: 1075-1084.

Rouhrazi K, Khodakaramian GJEJOPP (2014) Genetic fingerprinting of Iranian *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strains inducing black rot disease of crucifers. 139: 175-184.

Ruh M, Briand M, Bonneau S, Jacques M-A, Chen NWJBG (2017) *Xanthomonas* adaptation to common bean is associated with horizontal transfers of genes encoding TAL effectors. 18: 670.

Russell AB, Hood RD, Bui NK, Leroux M, Vollmer W, Mougous JDJN (2011) Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. 475: 343-347.

Ryan RP, Vorhölter F-J, Potnis N, Jones JB, Van Sluys M-A, Bogdanove AJ, Dow JM JNRM (2011) Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions. 9: 344-355.

Salanoubat M, Genin S, Artiguenave F, Gouzy J, Mangenot S, Arlat M, Billault A, Brottier P, Camus J, Cattolico L JN (2002) Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. 415: 497-502.

Salzberg SL, Sommer DD, Schatz MC, Phillippy AM, Rabinowicz PD, Tsuge S, Furutani A, Ochiai H, Delcher AL, Kelley DJBG (2008) Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99 A. 9: 1-16.

Schaad NW, Postnikova E, Lacy GH, Sechler A, Agarkova I, Stromberg PE, Stromberg VK, Vidaver AKJS, Microbiology A (2005) Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and “var. *fuscans*” of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. 28: 494-518.

Schandry N, Jacobs JM, Szurek B, Perez-Quintero ALJMPP (2018) A cautionary TALE: how plant breeding may have favoured expanded TALE repertoires in *Xanthomonas*. 19: 1297.

Schulze-Lefert P, Panstruga RJTIPS (2011) A molecular evolutionary concept connecting nonhost resistance, pathogen host range, and pathogen speciation. 16: 117-125.

Schürch A, Arredondo-Alonso S, Willems R, Goering RVJCM, Infection (2018) Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene–based approaches. 24: 350-354.

Schwartz AR, Potnis N, Timilsina S, Wilson M, Patané J, Martins Jr J, Minsavage GV, Dahlbeck D, Akhunova A, Almeida NJFIM (2015) Phylogenomics of *Xanthomonas* field strains infecting pepper and tomato reveals diversity in effector repertoires and identifies determinants of host specificity. 6: 535.

Seemann TJSFBVCFNR (2015) Snippy: fast bacterial variant calling from NGS reads.

Shimwela MM, Blackburn JK, Jones JB, Nkuba J, Narouei-Khandan HA, Ploetz RC, Beed F, Van Bruggen AJPP (2017) Local and regional spread of banana *Xanthomonas* wilt (BXW) in space and time in Kagera, Tanzania. 66: 1003-1014.

Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding JJMSB (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. 7: 539.

Silva CVM, Yamaki KY, Da Silva AGJN (2013) Identificação e caracterização da entomofauna em plantios de teca (*Tectona grandis*). 10.

Silva RA, Oliveira CM, Inomoto MMJTTP (2008) Fauna de fitonematóides em áreas preservadas e cultivadas da floresta amazônica no Estado de Mato Grosso. 33: 204-211.

Simpson AJG, Reinach FDC, Arruda P, Abreu FaD, Acencio M, Alvarenga R, Alves LC, Araya JE, Baia GS, Baptista CJN (2000) The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. 406: 151-157.

Smith EF (1914) Bacteria in relation to plant diseases: history, general considerations, vascular diseases. Carnegie institution of Washington

Souza DP, Oka GU, Alvarez-Martinez CE, Bisson-Filho AW, Dunger G, Hobeika L, Cavalcante NS, Alegria MC, Barbosa LR, Salinas RKJNC (2015) Bacterial killing via a type IV secretion system. 6: 1-9.

Starr MP (1981) The genus *Xanthomonas*. In.) The prokaryotes. Springer. pp. 742-763.

Starr MP, Stephens WLJOB (1964) Pigmentation and taxonomy of the genus *Xanthomonas*. 87: 293-302.

Sun H, Wei J, Li Y, Bao Y, Cui Y, Huang Y, Zhou H, Yang R, Rao G, Zhang MJPD (2017) First report of sugarcane leaf Chlorotic streak disease caused by *Xanthomonas sacchari* in Guangxi, China. 101: 1029-1029.

Sundin GWJaRP (2007) Genomic insights into the contribution of phytopathogenic bacterial plasmids to the evolutionary history of their hosts. 45: 129-151.

Swarup S, De Feyter R, Brlansky RH, Gabriel DWJP (1991) A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit cankerlike lesions on citrus. 81: 802-809.

Swings J, Van Den Mooter M, Vauterin L, Hoste B, Gillis M, Mew T, Kersters KJJOS, Microbiology E (1990) Reclassification of the Causal Agents of Bacterial Blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) and Bacterial Leaf Streak (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*) of Rice as Pathovars of *Xanthomonas oryzae* (ex Ishiyama 1922) sp. nov., nom. rev. 40: 309-311.

Swings J, Vauterin L, Kersters K (1993) The bacterium *Xanthomonas*. In.) *Xanthomonas*. Springer. pp. 121-156.

Tatusova T, Dicuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, Lomsadze A, Pruitt KD, Borodovsky M, Ostell JJNaR (2016) NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. 44: 6614-6624.

Teper D, Girija AM, Bosis E, Popov G, Savidor A, Sessa GJPP (2018) The *Xanthomonas euvesicatoria* type III effector XopAU is an active protein kinase that manipulates plant MAP kinase signaling. 14: e1006880.

Teper D, Sunitha S, Martin GB, Sessa GJPS, Behavior (2015) Five *Xanthomonas* type III effectors suppress cell death induced by components of immunity-associated MAP kinase cascades. 10: e1064573.

Thieme F, Szczesny R, Urban A, Kirchner O, Hause G, Bonas UJMP-MI (2007) New type III effectors from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* trigger plant reactions dependent on a conserved N-myristoylation motif. 20: 1250-1261.

Timilsina S, Kara S, Jacques MA, Potnis N, Minsavage G, Vallad G, Jones J, Fischer-Le Saux MJIOS, Microbiology E (2019a) Reclassification of *Xanthomonas gardneri* (ex Šutič 1957) Jones et al. 2006 as a later heterotypic synonym of *Xanthomonas cynarae* Trébaol et al. 2000 and description of *X. cynarae* pv. *cynarae* and *X. cynarae* pv. *gardneri* based on whole genome analyses. 69: 343-349.

Timilsina S, Pereira-Martin JA, Minsavage GV, Iruegas-Bocardo F, Abrahamian P, Potnis N, Kolaczkowski B, Vallad GE, Goss EM, Jones JBJFIM (2019b) Multiple recombination events drive the current genetic structure of *Xanthomonas perforans* in Florida. 10: 448.

Timilsina S, Potnis N, Newberry EA, Liyanapathirana P, Iruegas-Bocardo F, White FF, Goss EM, Jones JBJNRM (2020) *Xanthomonas* diversity, virulence and plant–pathogen interactions. 1-13.

Troster M, Felisberto-Rodrigues C, Christie PJ, Waksman GJCOISB (2014) Recent advances in the structural and molecular biology of type IV secretion systems. 27: 16-23.

Troup RS (1921) The silviculture of Indian trees. Clarendon Press

Tsujimoto S, Nakaho K, Adachi M, Ohnishi K, Kiba A, Hikichi YJJOGPP (2008) Contribution of the type II secretion system in systemic infectivity of *Ralstonia solanacearum* through xylem vessels. 74: 71-75.

Tsukamoto Filho ADA, Silva MLD, Couto L, Müller MDJRÁ (2003) Análise econômica de um plantio de teca submetido a desbastes. 27: 487-494.

Üstün S, Bartetzko V, Börnke FJPP (2013) The *Xanthomonas campestris* type III effector XopJ targets the host cell proteasome to suppress salicylic-acid mediated plant defence. 9: e1003427.

Vandamme P, Pot B, Gillis M, De Vos P, Kersters K, Swings JJMMBR (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. 60: 407-438.

Vauterin L, Hoste B, Kersters K, Swings JJIJOS, Microbiology E (1995) Reclassification of *xanthomonas*. 45: 472-489.

Verdier V, Boher B, Maraite H, Geiger J-PJA, Microbiology E (1994) Pathological and molecular characterization of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of cassava (*Manihot esculenta*). 60: 4478-4486.

Versalovic J, Schneider M, De Bruijn F, Lupski JRJMIM, Biology C (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. 5: 25-40.

Vicente JG, Rothwell S, Holub EB, Studholme DJIJS, Microbiology E (2017) Pathogenic, phenotypic and molecular characterisation of *Xanthomonas nasturtii* sp. nov. and *Xanthomonas floridensis* sp. nov., new species of *Xanthomonas* associated with watercress production in Florida. 67: 3645-3654.

Wayne L, Brenner D, Colwell R, Grimont P, Kandler O, Krichevsky M, Moore L, Moore W, Murray R, Stackebrandt EJIJOS, Microbiology E (1987) Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. 37: 463-464.

Weaver PLJDOA, Forest Service, Southern Forest Experiment Station (1993) *Tectona grandis* Lf teak. 18.

Weller DM, Saettler AJP (1980) Colonization and distribution of *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* in field-grown navy beans. 70: 500-506.

- Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KEJMG (2017a) Completing bacterial genome assemblies with multiplex MinION sequencing. 3.
- Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KEJPCB (2017b) Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. 13: e1005595.
- Woo P, Lau S, Teng J, Tse H, Yuen K-YJCM, Infection (2008) Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. 14: 908-934.
- Young J, Bull C, De Boer S, Firrao G, Garden L, Saddler G, Stead D, Takikawa Y, 2001. Committee on the Taxonomy of Plant Pathogenic Bacteria. International Standards for Naming Pathovars of Phytopathogenic Bacteria. In.
- Young J, Dye D, Bradbury J, Panagopoulos C, Robbs CJNZJOaR (1978) A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. 21: 153-177.
- Young J, Park D-C, Shearman H, Fargier EJS, Microbiology A (2008) A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. 31: 366-377.
- Zamani Z, Bahar M, Jacques MA, Lak MR, Akhavan AJWJOM, Biotechnology (2011) Genetic diversity of the common bacterial blight pathogen of bean, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, in Iran revealed by rep-PCR and PCR-RFLP analyses. 27: 2371-2378.
- Zeigler DRJ, Systematic IJO, Microbiology E (2003) Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. 53: 1893-1900.
- Zhai J, Luo Y, Zheng D, Huang XJJOP (2010) Evaluation of Genetic Diversity of Highly Virulent Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* by rep-PCR Fingerprinting. 158: 764-768.
- Zhang L, Xu J, Xu J, Chen K, He L, Feng JJOPD, Protection (2012) TssM is essential for virulence and required for type VI secretion in *Ralstonia solanacearum*. 119: 125-134.