



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

***Xanthomonas citri* pv. *viticola*: DETECÇÃO, DIVERSIDADE DE  
EFETORES E INTERAÇÃO COM HOSPEDEIRAS ALTERNATIVAS**

**JOÃO GILBERTO ALVES VILLELA**

**Brasília – DF**

**2019**

**João Gilberto Alves Villela**

***Xanthomonas citri* pv. *viticola*: DETECÇÃO, DIVERSIDADE DE EFETORES E INTERAÇÃO COM HOSPEDEIRAS ALTERNATIVAS**

Tese apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Fitopatologia pelo Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia

**Orientadora**

Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira, Dra.

**Brasília**

**Distrito Federal – Brasil**

**2019**

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

Villela, João Gilberto Alves Villela

*Xanthomonas citri* pv. *viticola*: Detecção, diversidade de efetores e interação com hospedeiras alternativas. Orientação: Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira. 2019. 164p.

Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.

1 – Cancro bacteriano da videira. 2 – *Vitis vinifera*. 3 – *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*.

## **REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA**

Villela, J.G.A. 2019. *Xanthomonas citri* pv. *viticola*: Detecção, diversidade de efetores e interação com hospedeiras alternativas. Brasília, Universidade de Brasília, Tese de Doutorado. 164p.

## **CESSÃO DE DIREITOS**

NOME DO AUTOR: João Gilberto Alves Villela

TÍTULO DA TESE DE DOUTORADO: *Xanthomonas citri* pv. *viticola*: Detecção, diversidade de efetores e interação com hospedeiras alternativas

GRAU: DOUTOR

ANO: 2019

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta tese de doutorado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. Ao autor reservam-se os outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da Professora **Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira**, com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

***Xanthomonas citri* pv. *viticola*: DETECÇÃO, DIVERSIDADE DE EFETORES E INTERAÇÃO COM HOSPEDEIRAS ALTERNATIVAS**

**João Gilberto Alves Villela**

TESE APROVADA em 11/07/2019, por:

---

Dra. Abi Soares dos Anjos Marques (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)  
Examinadora Externa

---

Dra. Mirtes Freitas Lima (Embrapa Hortaliças)  
Examinadora Externa

---

Dr. Helson Mario Martins Do Vale (Universidade de Brasília)  
Examinador Interno

---

Dra. Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira (Universidade de Brasília)  
Orientadora

---

Dra. Thais Ribeiro Santiago (Universidade de Brasília)  
Suplente

Brasília – Distrito Federal  
Brasil  
2019

*Dedicatória*

Dedico essa tese aos meus pais,  
Valdemira Alves da Silva Villela e  
Gilberto Mauro Villela, por todo  
carinho, apoio, incentivo e por estarem  
sempre presentes em minha vida.

## AGRADECIMENTOS

- Primeiramente, agradeço a Deus, pela presença constante em minha vida, dando-me proteção, coragem e força para conquistar meus objetivos.
- À minha irmã Nathalia Alves Villela, pelo companheirismo no período que moramos juntos em Brasília em busca dos nossos sonhos.
- À minha namorada Laura Vieira, por todo amor, apoio e compreensão.
- À minha orientadora Profa. Dra. Marisa A. S. Velloso Ferreira, pela confiança depositada, pelos ensinamentos recebidos, pelo incentivo e amizade.
- Às pesquisadoras Dra. Patrícia Ritschel e Dra. Maria Angélica G. Barbosa pelos ensinamentos, contribuições e apoio para a realização deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Maurício Rossato, por todo conhecimento repassado e contribuições neste trabalho.
- À pesquisadora Dra. Angela Metha e sua orientada Mariana Maximiano, pelas contribuições no Capítulo 3.
- À Kétini Baccin, por todo apoio durante a realização dos experimentos realizados na Embrapa Uva e Vinho.
- Ao Samuel Elias, pelas contribuições nas análises filogenéticas.
- Aos Membros componentes da banca examinadora, Dra. Abi Soares, Dra. Mirtes Freitas, Dr. Helson Mario Martins e Dra. Thais Ribeiro pelas contribuições na correção, incentivo e apoio recebido.
- A todo corpo docente do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos e conselhos repassados.
- A todos funcionários do Departamento de Fitopatologia, pelo apoio e convivência desde a época do Mestrado. Em especial ao Arenildo Soares, pela amizade e por todo

conhecimento repassado e a Viviane Teixeira, pela ajuda na montagem dos experimentos em casa de vegetação.

- A todos os colegas com os quais convivi desde o Mestrado, os quais tornaram essa caminhada mais fácil e divertida.
- À Universidade de Brasília, por toda minha formação acadêmica.
- À CAPES e ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado.
- A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>Lista de Tabelas</b> .....	i
<b>Lista de Figuras</b> .....	iii
<b>Resumo Geral</b> .....	ix
<b>General Abstract</b> .....	xi
<b>Capítulo 1: Introdução</b> .....	1
1. Cultura da videira.....	2
2. Doenças da videira.....	3
3. Cancro bacteriano da videira.....	4
4. Justificativas.....	15
5. Objetivos.....	16
6. Referências.....	18
<b>Capítulo 2: Detecção de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>viticola</i> em videiras por PCR em tempo real e BIO-PCR com <i>primers</i> desenhados a partir de sequências de genes de patogenicidade e da xantomonadina</b> .....	26
Resumo.....	27
Abstract.....	28
1. Introdução.....	29
2. Material e Métodos.....	32
3. Resultados.....	39
4. Discussão.....	42
5. Referências.....	47
6. Anexos.....	68
<b>Capítulo 3. Interação entre <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>viticola</i> e a hospedeira alternativa natural, <i>Senna obtusifolia</i>, e espécies da família <i>Amaranthaceae</i></b> .....	81
Resumo.....	82
Abstract.....	83
1. Introdução.....	84
2. Material e Métodos.....	86



3. Resultados.....	94
4. Discussão.....	99
5. Referências.....	104

**Capítulo 4. Repertório de genes efetores do tipo III em *Xanthomonas citri* pv. *viticola*.....**

Resumo.....	128
Abstract.....	129
1. Introdução.....	130
2. Material e Métodos.....	131
3. Resultados.....	133
4. Discussão.....	137
5. Referências.....	139

<b>Conclusões Gerais e Perspectivas .....</b>	<b>142</b>
---	------------

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 2

<b>Tabela 1.</b> Isolados bacterianos utilizados no estudo de detecção de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>viticola</i> .....	53
<b>Tabela 2.</b> <i>Primers</i> utilizados no estudo de detecção de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>viticola</i> .....	54
<b>Tabela 3.</b> Caracterização cultural e bioquímica de bactérias não patogênicas associadas a folhas e pecíolos de videira.....	55
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros de desempenho da PCR em tempo real (SYBR <sup>®</sup> Green), com o par de <i>primers</i> Xcv18F/19R, avaliados através de curvas padrão geradas a partir de diluições seriadas (1:10) de DNA genômico (1,5 pg $\mu\text{l}^{-1}$ a 150 fg $\mu\text{l}^{-1}$ ) e de suspensão bacteriana ( $10^8$ UFC $\text{ml}^{-1}$ a 1 UFC $\text{ml}^{-1}$ ) de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>viticola</i> (Xcv).....	57
<b>Tabela 5.</b> Especificidade de <i>primers</i> desenhados e selecionados para detecção de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>viticola</i> em videira.....	58
<b>Tabela 6.</b> Sensibilidade de detecção de DNA genômico (parte superior) e suspensão bacteriana (parte inferior) de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>viticola</i> (UnB 1188) por PCR convencional (cPCR) e PCR em tempo real (qPCR). Os valores Ct indicados em qPCR referem-se a média de dois ensaios independentes.....	59
<b>Tabela 7.</b> Limiar de detecção de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>viticola</i> (UnB 1188) em extratos de folhas de videira misturados à suspensão bacteriana, por PCR convencional (cPCR) e PCR em tempo real (qPCR), após extração total de DNA (parte superior) e enriquecimento por 72h em meio semisseletivo NYDAM (parte inferior). Os valores Ct indicados em qPCR referem-se a média de dois ensaios independentes.....	60
<b>Tabela 8.</b> Detecção de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>viticola</i> , por PCR, em folhas de videira sintomáticas coletadas em área de ocorrência do cancro bacteriano em Petrolina, PE.....	61
<b>Tabela 9</b> Detecção de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>viticola</i> , por PCR, em amostras de videira e de <i>Amaranthus</i> sp., assintomáticas, coletadas em área de ocorrência do cancro bacteriano em Petrolina, PE.....	62

### Capítulo 3

<b>Tabela 1.</b> Isolados de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>viticola</i> utilizados no estudo de interação com hospedeiras alternativas.....	110
---	-----

#### Capítulo 4.

<b>Tabela 1.</b> Isolados bacterianos utilizados na caracterização do repertório de genes efetores do tipo III em <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>viticola</i> .....	149
<b>Tabela 2.</b> Genomas dos isolados pertencente a diferentes patovares de <i>Xanthomonas citri</i> usados neste estudo.....	150
<b>Tabela 3.</b> <i>Primers</i> utilizados na caracterização do repertório de efetores do tipo III em <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>viticola</i> .....	152
<b>Tabela 4.</b> Repertório de genes efetores tipo III (T3Es) nos genomas de 53 isolados de <i>Xanthomonas citri</i> . A presença de um gene efector T3Es é indicada pelo número 1 e sua ausência pelo número 0. Os genes efetores com sequências incompletas ou mutações <i>frameshift</i> resultando em produto gênico truncado são indicados pelo símbolo $\Psi$ .....	154
<b>Tabela 5.</b> Severidade de sintomas e população final de isolados de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>viticola</i> em folhas de videira ( <i>Vitis vinifera</i> var. Sagraone), 12 dias após a inoculação.....	156

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

**Figura 1.** Sintomas do cancro bacteriano da videira causado por *Xanthomonas citri* pv. *viticola*. A. Lesões necróticas no limbo foliar e na nervura; B. Lesões necróticas no pecíolo e nas nervuras; C. Lesões necróticas nas folhas e nos ramos; D. Cancro no ramo; E. Cancro no engaço; F. Lesões necróticas no engaço e na baga. Fotos: Maria Angélica Guimarães Barbosa..... 6

### Capítulo 2

**Figura 1.** Localização dos *primers* Xpig em alinhamento do *cluster* da xantomonadina de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (acesso CBZT010000000) e *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* (KF991092). (a) Visão geral da localização dos *primers forward* Xpig em uma região intergênica de *X. citri* pv. *viticola* e a presença de um *transposon* em *X. citri* pv. *mangiferaeindicae*. (b) Visão ampliada da localização dos *primers* Xpig, mostrando nenhuma identidade com *X. citri* pv. *mangiferaeindicae*..... 63

**Figura 2.** Especificidade dos pares de *primers* Xcv18F/19R (a) e Xpig2F/1R (b) para detecção e identificação de *Xanthomonas citri* pv. *viticola*. Linhas 1: NCPPB 2475; 2: UnB 1188; 3: UnB 1205; 4: UnB 92; 5: UnB 764; 6: UnB 773; 7: UnB 607; 8: UnB 1395; 9: UnB 187; 10-11: Bactérias epifíticas e/ou endofíticas da videira; 12: DNA de videira; 13: Controle Negativo PCR; M: Marcador 100 pb (Ludwig) Linhas 1-3: *Xanthomonas citri* pv. *viticola*; 4: *X. citri* pv. *citri*; 5: *X. citri* pv. *mangiferaeindicae*; 6: *X. citri* pv. *fuscans*; 7: *X. axonopodis* pv. *ricini*; 8: *X. axonopodis* pv. *passiflorae*; 9: *X. axonopodis* pv. *phaseoli*..... 64

**Figura 3.** PCR em tempo real (SYBR® Green) com o par de *primers* Xcv18R/19F, utilizando como molde DNA genômico (5 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ ) de diferentes espécies de *Xanthomonas*. (a) Curvas de amplificação. (b) Curvas de *melting*. Legenda: A - *X. citri* pv. *viticola* (UnB 1188); B - *X. citri* pv. *viticola* (NCPPB 2475); C - *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (UnB 1395); D - *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (UnB 187). E - *X. axonopodis* pv. *ricini* (UnB 607); F - *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* (UnB 764); G - *X. citri* pv. *fuscans* (UnB 773); H - *X. citri* pv. *citri* (UnB 92)..... 65

**Figura 4.** Curvas de amplificação da PCR em tempo real (SYBR® Green) com o par de *primers* Xcv18F/19R, para detecção de (a) DNA genômico (1,5 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  a 150 fg  $\mu\text{l}^{-1}$ ) e (b) suspensão bacteriana ( $10^8$  a 1 UFC  $\text{ml}^{-1}$ ) de *Xanthomonas citri* pv. *viticola*

(UnB 1188). Legenda (a): A - Controle Negativo (água destilada esterilizada); B - 1,5 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ ; C - 150 pg  $\mu\text{l}^{-1}$ ; D - 15 pg  $\mu\text{l}^{-1}$ ; E: 1,5 pg  $\mu\text{l}^{-1}$ ; F: 150 fg  $\mu\text{l}^{-1}$ . Legenda (b): Controle Negativo (água destilada esterilizada); B -  $10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ; C -  $10^7$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ; D -  $10^6$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ; E -  $10^5$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ; F -  $10^4$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ; G -  $10^3$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ; H  $10^2$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ..... 66

**Figura 5.** Curvas padrão gerada por PCR em tempo real (SYBR<sup>®</sup> Green) com o par de *primers* Xcv18F/19R, para detecção de (a) DNA genômico (1,5 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  a 150 fg  $\mu\text{l}^{-1}$ ) e (b) suspensão bacteriana ( $10^8$  a 1 UFC  $\text{ml}^{-1}$ ) de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (UnB 1188)..... 67

### Capítulo 3

**Figura 1.** Escala de notas utilizada para quantificação da severidade de sintomas causados por *Xanthomonas citri* pv. *viticola* em *Senna obtusifolia*, após inoculação suspensão bacteriana ( $10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ) por infiltração..... 111

**Figura 2.** Gel de agarose (1,5 %) mostrando os produtos da PCR (598 pb), obtidos com os *primers* KanF/R que indicam a presença ou ausência do gene *aph*, que confere resistência ao antibiótico canamicina em isolados mutantes ou selvagens de *Xanthomonas citri* pv. *viticola*. Linhas 1-2: isolado selvagem A3; 3-4: isolado selvagem UnB 1188; 5-6: isolado mutante A3<sup>kan</sup>; 7-8: isolado mutante UnB 1188<sup>kan</sup>; 9: Controle Negativo PCR (água destilada esterilizada); M: Marcador 100 pb (Ludwig)..... 112

**Figura 3.** Teste da habilidade de hidrólise do amido por isolados mutantes e selvagens de *Xanthomonas citri* pv. *viticola*. A integração do vetor de expressão pPM7g no genoma da bactéria leva ao *knockout* do gene *amy*. A integração no *locus amy* pode ser detectado por cultivo dos transformantes NYG contendo amido solúvel (0,2%). Mutantes de Xcv não conseguem degradar amido e halos não são visualizados quando o meio é corado com solução de iodo lugol. A: Isolado selvagem UnB 1188 (parte superior) e isolado mutante UnB 1188<sup>kan</sup> (parte inferior). B: Isolado selvagem A3 (parte superior) e isolado mutante A3<sup>kan</sup> (parte inferior)..... 113

**Figura 4.** Teste de habilidade de crescimento de isolados mutantes e selvagens de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* em meio de cultura NYG acrescido de canamicina, após 48 horas a 28°C. A: Isolado mutante UnB 1188<sup>kan</sup> (parte superior) e isolado selvagem UnB 1188 (parte inferior). B: Isolado mutante A3<sup>kan</sup> (parte superior) e isolado selvagem A3 (parte inferior)..... 114

- Figura 5.** Curvas de crescimento dos isolados selvagens (UnB 1188 e A3) e mutantes (UnB 1188<sup>kan</sup> e A3<sup>kan</sup>) de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* cultivados em meio líquido (NYDA) a 28 °C, sob agitação (200 rpm) por 24 horas. Cada ponto no gráfico corresponde à média de densidades ópticas (O.D. 600nm) calculadas a partir de dados coletados em dois ensaios independentes..... 115
- Figura 6.** Dinâmica populacional de isolados selvagens (UnB 1188 e A3) e mutantes (UnB 1188<sup>kan</sup> e A3<sup>kan</sup>) de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* em videira da variedade Thompson Seedless, após inoculação foliar por infiltração com suspensão bacteriana ajustada para 10<sup>8</sup> UFC ml<sup>-1</sup>. Os resultados representam a média de dois ensaios independentes. Dias após a inoculação seguido pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 116
- Figura 7.** Sintomas causados por *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Xcv) em folhas e folíolos de *Senna obtusifolia*, 12 dias após inoculação de suspensão bacteriana (10<sup>8</sup> UFC ml<sup>-1</sup>) pelo método de fricção com gaze. A, B e C: Controle negativo, superfície adaxial e abaxial de folhas e folíolos inoculados com solução esterilizada sulfato de magnésio (10 mM) contendo de Tween 20 (0,05%); D, E, F: Sintomas de clorose, necrose e cancro observados na superfície adaxial e abaxial de folhas e folíolos; G: *Close-up* dos sintomas..... 117
- Figura 8.** Sintomas de clorose e necrose causados por *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Xcv) em folhas de plantas pertencentes a família Amaranthaceae, 12 dias após inoculação. Folhas do lado esquerdo de cada parte da figura representam o controle negativo, inoculação com solução esterilizada de sulfato de magnésio (10 mM) contendo Tween 20 (0,05%) e o lado direito folhas inoculadas com suspensão bacteriana (10<sup>8</sup> UFC ml<sup>-1</sup>) de Xcv pelo método de fricção com gaze. A: *Amaranthus cruentus*; B: *A. spinosus*; C: *Chenopodium giganteum*; D: *C. quinoa*..... 118
- Figura 9.** Dinâmica da população epifítica do isolado selvagem (P7) e mutante (A3<sup>kan</sup>) de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* em *Senna obtusifolia*, após inoculação por pulverização de suspensão bacteriana (10<sup>8</sup> UFC ml<sup>-1</sup>). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes. Dias após a inoculação seguido pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 119
- Figura 10.** Dinâmica da população total do isolado selvagem (P7) e mutante (A3<sup>kan</sup>) de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* em *Senna obtusifolia*, após inoculação por fricção

com gaze umedecida com suspensão bacteriana ( $10^8$ UFC ml <sup>-1</sup> ). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes. Dias após a inoculação seguido pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	120
<b>Figura 11.</b> Progresso da severidade dos sintomas em folhas de <i>Senna obtusifolia</i> causados por <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>viticola</i> , 4-20 dias após inoculação de suspensão bacteriana ( $10^8$ UFC ml <sup>-1</sup> ) por infiltração.....	121
<b>Figura 12.</b> Sintoma de cancro observado em caule de <i>Senna obtusifolia</i> , 20 dias após a inoculação de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>viticola</i> . As plantas foram inoculadas com os isolados selvagem e mutante, P7 (A) e A3 <sup>kan</sup> (B), respectivamente.....	122
<b>Figura 13.</b> Colonização acropetal e basipetal de <i>Senna obtusifolia</i> por dois isolados de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>viticola</i> , um selvagem (P7) e um mutante resistente a canamicina (A3 <sup>kan</sup> ). As avaliações foram realizadas aos 14 (A) e aos 21 (B) dias após a inoculação. Populações foram determinadas em segmentos de caule (1 cm) coletados a distâncias de 1, 5, 10, 15 cm acima e abaixo (-) do ponto de inoculação (PI). Asteriscos denotam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade em A3 <sup>kan</sup> comparado com P7, em cada distância e tempo de avaliação.....	123
<b>Figura 14.</b> Gel de agarose (1,5 %) mostrando os produtos da PCR (166 pb), obtidos com os <i>primers</i> específicos (Xpig2F/1R) que indicam a presença ou ausência de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>viticola</i> (Xcv) em amostras de segmentos de caule de <i>Senna obtusifolia</i> coletados em diferentes distâncias acima (+) e abaixo (-) do ponto de inoculação (PI). As plantas foram inoculadas com os isolados selvagem e mutantes, P7 (A) e A3 <sup>kan</sup> (B), respectivamente. Linha 1: PI; 2: +1 cm; 3: +5 cm; 4: +10 cm; 5: +15; 6: -1 cm; 7: -5 cm; 8: -10 cm; 9: -15; 10: Controle Negativo PCR (água destilada esterilizada); 11: Controle Negativo experimento [plantas inoculadas com solução esterilizada de sulfato de magnésio (10 mM) contendo Tween 20 (0,05%)]; 12: Controle positivo PCR [DNA Xcv (10 ng $\mu$ l <sup>-1</sup> )]; M: Marcador 100 pb (Ludwig).....	124
<b>Figura 15.</b> Dinâmica da população total do isolado AM1 de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>viticola</i> em espécies de plantas da família Amaranthaceae após inoculação por fricção com gaze umedecida com suspensão bacteriana ( $10^8$ UFC ml <sup>-1</sup> ). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes. Colunas com a mesma letra minúscula para espécies da família Amaranthaceae e maiúscula para tempos de	

avalição (dias após a inoculação) não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 125

**Figura 16.** Progresso da incidência de sintomas (clorose e necrose) em folhas de plantas da família Amaranthaceae causados por *Xanthomonas citri* pv. *viticola*, isolado AM1, 4-20 dias após a inoculação de suspensão bacteriana ( $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>) pelo método de fricção com gaze..... 126

**Figura 17.** Colonização acropetal do isolado AM1 de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* em espécies de plantas da família Amaranthaceae. Populações foram determinadas em segmento de caule (1 cm) coletados a 5 cm acima do ponto de inoculação. Os resultados representam a média de dois ensaios independentes. Colunas com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 127

#### Capítulo 4

**Figura 1.** Sequências parciais do gene efetor do tipo III (T3Es) *xopAD* de três isolados de *Xanthomonas citri* pv. *viticola*, o patotipo indiano (LMG 965) e dois brasileiros (CCRMXCV 80 e CFBP 7764). A localização da deleção de um nucleotídeo na posição 1384 na sequência do patotipo indiano está indicada pelo símbolo (-). Esta deleção resulta em uma proteína truncada. A posição prematura do códon de parada está indicada por um asterisco..... 157

**Figura 2.** Filogenia de isolados de *Xanthomonas citri* pertencentes a diferentes patovares com base nas sequências do gene efetor do tipo III, *hpaA*. A árvore filogenética foi construída usando o método de Máxima Verossimilhança. A confiança dos nós foi testada com 1.000 réplicas de *bootstrap*. Valores de *bootstrap* abaixo de 50 % não são mostrados. A escala representa o número de substituições por site. A árvore está enraizada na sequência do gene *hpaA* do isolado 85-10 de *X. euvesicatoria*..... 158

**Figura 3.** Filogenia de isolados de *Xanthomonas citri* pertencentes a diferentes patovares com base nas sequências do gene efetor do tipo III, *xopA*. A árvore filogenética foi construída usando o método de Máxima Verossimilhança. A confiança dos nós foi testada com 1.000 réplicas de *bootstrap*. Valores de *bootstrap* abaixo de 50 % não são mostrados. A escala representa o número de substituições por site. A árvore está enraizada na sequência do gene *xopA* do isolado 85-10 de *X. euvesicatoria*..... 159

**Figura 4.** Filogenia de isolados de *Xanthomonas citri* pertencentes a diferentes patovares com base nas sequências do gene efetor do tipo III, *xopN*. A árvore



filogenética foi construída usando o método de Máxima Verossimilhança. A confiança dos nós foi testada com 1.000 réplicas de *bootstrap*. Valores de *bootstrap* abaixo de 50 % não são mostrados. A escala representa o número de substituições por site. A árvore está enraizada na sequência do gene *xopN* do isolado 85-10 de *X. euvesicatoria*..... 160

**Figura 5.** Filogenia de isolados de *Xanthomonas citri* pertencentes a diferentes patovares com base nas sequências do gene efetor do tipo III, *xopQ*. A árvore filogenética foi construída usando o método de Máxima Verossimilhança. A confiança dos nós foi testada com 1.000 réplicas de *bootstrap*. Valores de *bootstrap* abaixo de 50 % não são mostrados. A escala representa o número de substituições por site. A árvore está enraizada na sequência do gene *xopQ* do isolado 85-10 de *X. euvesicatoria*..... 161

**Figura 6.** Filogenia de isolados de *Xanthomonas citri* pertencentes a diferentes patovares com base nas sequências do gene efetor do tipo III, *xopZ1*. A árvore filogenética foi construída usando o método de Máxima Verossimilhança. A confiança dos nós foi testada com 1.000 réplicas de *bootstrap*. Valores de *bootstrap* abaixo de 50 % não são mostrados. A escala representa o número de substituições por site. A árvore está enraizada na sequência do gene *xopZ1* do isolado 85-10 de *X. euvesicatoria*..... 162

## Resumo Geral

Villela, João Gilberto Alves. *Xanthomonas citri* pv. *viticola*: **detecção, diversidade de efetores e interação com hospedeiras alternativas**. 2019. 164p. Doutorado em Fitopatologia – Universidade Brasília, Brasília, DF.

O cancro bacteriano da videira, causado por *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Xcv), é a doença de maior preocupação entre os viticultores da região do Submédio do Vale do São Francisco, sendo responsável por quedas expressivas na produção, principalmente em variedades de uvas finas para mesa. Devido à sua ocorrência restrita e por representar risco ao desenvolvimento da viticultura nacional, o agente etiológico da doença é regulamentado como uma Praga Quarentenária Presente (PQP). Os objetivos principais deste estudo foram: (i) estabelecer protocolos de detecção molecular de Xcv em videiras assintomáticas via PCR em tempo real (qPCR), (ii) investigar aspectos da interação entre Xcv e hospedeiras alternativas e (iii) caracterizar o repertório de genes efetores do tipo III (T3Es) em Xcv. Para o desenvolvimento de protocolos de detecção molecular, foram desenhados e selecionados dois novos pares de *primers*, tendo como alvos sequências do gene de patogenicidade *hrpB* (Xcv18F/19R) e do *cluster* referente à síntese do pigmento xantomonadina (Xpig2F/1R). O par Xcv18F/19R apresentou especificidade limitada, mas foi eficiente para uso tanto em PCR convencional (cPCR) quanto em qPCR, enquanto o par Xpig2F/1R foi altamente específico para Xcv, mas mostrou baixa eficiência no formato qPCR. O limiar de detecção de Xcv em material vegetal foi determinado por extração de DNA total e enriquecimento das amostras em meio semisseletivo seguido de cPCR com os dois pares de *primers* selecionados e qPCR apenas com o par Xcv18F/19R. Para tanto, foram preparados extratos de folhas de videira com concentrações de inóculo variando de  $10^7$  a  $1$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ . Utilizando a etapa prévia de enriquecimento das amostras em meio de cultura observou-se um aumento de 10 vezes na sensibilidade, quando comparado com a extração de DNA total. A maior sensibilidade foi obtida no formato qPCR, detectando-se uma concentração inicial de  $10$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ . Em condições de infecção natural no campo, amostras de videiras sintomáticas e assintomáticas foram testadas por dois protocolos: qPCR com o par de *primers* Xcv18F/19R e cPCR com o par Xpig2F/1R. Nos dois casos empregou-se o enriquecimento prévio dos extratos em meio de cultura por 36-72h. Com ambos protocolos, detectou-se a presença de Xcv em todas as amostras sintomáticas. Nas amostras assintomáticas, a bactéria foi detectada em 93,4% por qPCR e em 89,5% por cPCR. Os protocolos desenvolvidos neste estudo apresentam vantagens

quanto à especificidade e sensibilidade, sendo ferramentas valiosas para a detecção e identificação de Xcv em diferentes situações, tanto para fins de pesquisa quanto para rotinas de inspeção fitossanitária. Estudos de interação de Xcv com hospedeiras alternativas foram conduzidos para investigar a capacidade de colonização e translocação vascular do patógeno em *Senna obtusifolia*, e em espécies da família Amaranthaceae (*Amaranthus cruentus*, *A. spinosus*, *Chenopodium giganteum* e *C. quinoa*). Ensaio de dinâmica populacional demonstraram que Xcv foi capaz de colonizar plantas de todas as cinco espécies avaliadas, além de sobreviver epifiticamente, por pelo menos 20 dias, em populações altas em folhas de *S. obtusifolia*. A capacidade de translocação vascular foi avaliada por inoculação do patógeno em caule e posterior detecção por BIO-PCR. Em plantas de *S. obtusifolia*, foi avaliada a translocação acropetal e basipetal, e em plantas da família Amaranthaceae, apenas a translocação acropetal. Resultados sugerem que Xcv é capaz de colonizar de forma sistêmica todas as espécies avaliadas. Para caracterizar o repertório de genes T3Es em Xcv, foram realizadas análises *in silico* nos três genomas disponíveis, pertencentes a dois isolados brasileiros (CCRMXCV 80 e CFBP 7764) e o patotipo indiano (LMG 965). Como resultado, foi identificado um repertório único de 27 genes. Porém, ao analisar as sequências de cada gene, foi observado uma deleção de um nucleotídeo no gene *xopAD* do patotipo indiano, resultando em uma proteína truncada. A distribuição de 29 genes T3Es de *Xanthomonas* spp., incluindo 20 dos genes detectados nos três genomas de Xcv, foi determinada por PCR em uma coleção de 68 isolados de Xcv. A diversidade de virulência dos isolados de Xcv em videira também foi avaliada com o objetivo de investigar possível correlação com a presença dos genes T3Es. Os resultados de PCR revelaram a presença de 22 genes T3Es em todos os isolados de Xcv, em contraste com uma alta diversidade de virulência em videira entre os isolados.

**Palavras chave:** cancro bacteriano da videira, diagnose, *Vitis vinifera*, *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*

## General Abstract

Villela, João Gilberto Alves. *Xanthomonas citri* pv. *viticola*: detection, diversity of effectors and interaction with alternative hosts. 2019. 164p. Doctorate in Plant Pathology – Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

Grapevine bacterial canker, caused by *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Xcv), is one of the most important diseases concerning table grape production in Submédio do Vale do São Francisco region, in Brazil. Because of its restricted geographical occurrence and the risk to the development of national viticulture, Xcv is regulated as a Present Quarantine Pest. The main objectives of this study were: (i) to develop molecular detection protocols of Xcv in asymptomatic grapevines via real-time PCR (qPCR), (ii) to investigate the interaction between Xcv and alternative hosts and (iii) to characterize the repertoire of type III effector genes (T3Es) in Xcv. For the development of molecular detection protocols, two new pairs of primers were designed and selected, having as targets sequences of the pathogenicity gene *hrpB* (Xcv18F/19R) and the xanthomonadin-coding cluster (Xpig2F/1R). The Xcv18F/19R primers showed limited specificity, but were efficient for use in both cPCR and qPCR, while Xpig2F/1R primers were highly specific for Xcv, but showed low efficiency in the qPCR format. The detection limit of Xcv in plant material was determined by total DNA extraction and sample enrichment in semi-selective medium followed by cPCR with the two selected primer pairs and qPCR with Xcv18F/19R. Grapevine leaf extracts spiked with bacterial suspensions at concentrations ranging from  $10^7$  to 1 CFU ml<sup>-1</sup> were prepared. Enrichment of plant extracts in semi-selective culture medium before PCR allowed a significant increase (10x) in sensitivity when compared to total DNA extraction protocol, making it possible to detect as low as 10 CFU ml<sup>-1</sup>. Under natural infection conditions, samples of symptomatic and asymptomatic grapevines were tested by two protocols: qPCR with primers *hrpB* and cPCR with xanthomonadin primers. In both cases, the plant extracts were enriched in culture medium for 36-72h. Xcv was detected in all symptomatic samples, and the result was confirmed by cPCR with the more specific primers Xpig2F/1R. For the asymptomatic samples, Xcv was detected in 93.4% with qPCR and in 89.5% of the samples with cPCR. These two protocols offer advantages in terms of sensitivity and specificity, being valuable tools for detection and identification of Xcv in different situations, both for research purposes and for phytosanitary inspection routines. The colonization ability and vascular translocation of Xcv on alternative hosts was investigated by pathogenicity assays in *Senna obtusifolia*, and in species of the Amaranthaceae family

(*Amaranthus cruentus*, *A. spinosus*, *Chenopodium giganteum* and *C. quinoa*). Population dynamics assays showed that Xcv was able to colonize all plant species evaluated, and also to survive epiphytically for at least 20 days in high populations on leaves of *S. obtusifolia*. The ability to invade plant tissues systemically was evaluated by stem inoculation and subsequent detection by BIO-PCR. For *S. obtusifolia* acropetal and basipetal translocation was detected, but only acropetal translocation was observed in Amaranthaceae plants. Xcv translocated in all plants evaluated, indicating that colonization may occur systemically. To characterize the repertoire of T3Es genes in Xcv, *in silico* analysis were performed with the three available whole genomes, from two Brazilian strains (CCRMXCV 80 and CFBP 7764) and the Indian pathotype (LMG 965). As a result, a unique repertoire of 27 genes was identified. However, by analyzing the sequences of each gene, a deletion of a nucleotide in the *xopAD* gene of the Indian pathotype was observed, resulting in a truncated protein. The distribution of 29 T3Es from *Xanthomonas* spp., including 20 genes detected in the three Xcv genomes, was determined by PCR in a collection of 68 Xcv strains. The virulence of Xcv strains in grapevine was also evaluated in order to investigate a possible correlation with the distribution of T3Es genes. PCR results revealed the presence of 22 T3Es genes in all Xcv strains, in contrast, higher diversity virulence on grapevine leaves among strains was detected.

**Keywords:** grapevine bacterial canker, PCR-based diagnosis, *Vitis vinifera*, *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*

# CAPÍTULO 1

---

## **Introdução**

## INTRODUÇÃO

### 1. Cultura da Videira

A videira surgiu no Período Terciário, milhões de anos antes do aparecimento do homem, provavelmente na atual Groenlândia, conforme comprovam achados arqueológicos e, a partir desse ponto, as videiras primitivas dispersaram-se para novas regiões, diferenciando-se em novas espécies (Sousa, 1996). Atualmente, considera-se a existência de três centros de origem: Eurásia, América e Ásia Oriental (OIV, 2017).

A videira pertence ao Reino Plantae; Sub-reino: Viridiplantae; Infra-reino: Streptophyta; Superdivisão: Embryophyta; Divisão: Tracheophyta; Subdivisão: Spermatophytina; Classe Magnoliopsida; Ordem Vitales; Família: Vitaceae; Gênero: *Vitis* (ITIS, 2011). O gênero *Vitis* possui cerca de 80 espécies, incluindo videiras selvagens e cultivadas. Existem, no mundo, numerosas variedades de uvas cultivadas, as denominadas uvas finas (*Vitis vinifera* L.) e as uvas comuns (*V. labrusca* L., outras espécies e seus híbridos) (Reisch & Pratt, 1996; OIV, 2017).

As uvas são usadas em todo o mundo para consumo *in natura* e para processamento. Segundo dados da FAO (2017), a produção mundial de uvas foi, em 2017, de 74,28 milhões de toneladas, em uma área cultivada de 6,9 milhões de hectares. Os três maiores produtores são: China, Itália e Estados Unidos. Juntos esses países são responsáveis por 36,26 % da produção mundial. O Brasil ocupa a 11ª colocação, representando 2,6 % da produção total. Em 2018, a produção de uvas no Brasil foi de 1,59 milhões de toneladas, em uma área de 75.481 hectares. O estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor, seguido de Pernambuco e São Paulo (IBGE, 2018). A região Sul destaca-se como a maior produtora do país, porém a uva produzida nessa região destina-se, principalmente, à produção de vinho, sucos e derivados, enquanto nas regiões Nordeste e Sudeste predomina a produção de uvas de mesa (Mello, 2018).

A produção de uva no Nordeste do Brasil concentra-se principalmente no Submédio do Vale do São Francisco, localizado na região semiárida dos estados de Pernambuco e Bahia, nos polos de fruticultura em Petrolina e Juazeiro, respectivamente. Estima-se que a participação dessa região pode chegar a 90% da produção nacional e a 99% das exportações nacionais de uvas finas para mesa com e sem sementes (Lazzarotto & Fioravanço, 2013).

A viticultura no Submédio do Vale do São Francisco vem ganhando destaque, não apenas pela expansão da área cultivada e do volume de produção, mas principalmente pela alta produtividade, acima da média nacional (IBGE, 2018). A alta produtividade alcançada na região ocorre em virtude das condições climáticas da região, que aceleram os processos fisiológicos da videira, aliado ao manejo da irrigação e podas programadas, fatores que propiciam até duas safras e meia por ano (Silva & Correia, 2010).

A cultura da videira encontra-se em expansão para outros estados sem tradição da viticultura, como Distrito Federal, Goiás e Mato Grosso (IBGE, 2018). Apesar de todos os aspectos positivos da expansão da cultura, o manejo inadequado pode ser problemático, a isso deve-se somar condições climáticas favoráveis a problemas fitossanitários.

## **2. Doenças da videira**

A videira é uma das principais fruteiras cultivadas no mundo (FAO, 2017). O manejo da cultura é diversificado, pois varia de acordo com o clima local. Essa diversificação faz com que a videira se desenvolva sob condições ambientais totalmente diferentes, e assim, os cultivos são acometidos por problemas fitossanitários distintos em cada região, dentre estes, destacam-se as doenças bióticas, causadas por fungos, vírus, nematoides e bactérias (Barbosa et al., 2016).

No Brasil, as principais doenças da videira causadas por fungos são: oídio (*Uncinula necator*), mofo cinzento (*Botryotinia fuckeliana*), antracnose (*Elsinoe ampelina*), podridão seca ou morte descendente (*Botryodiplodia theobromae*), fusariose (*Fusarium oxysporum* f. sp.



*herbemontis*) e a ferrugem (*Phakopsora euvitis*) (Garrido & Gava, 2014). Além destas, o míldio, causado pelo oomiceto *Plasmopara viticola*, também é considerada uma importante doença da cultura no país (Amorim et al., 2016). Recentemente Canale et al. (2019) relataram, pela primeira vez no país, a ocorrência do fungo *Pleurostomophora richardsiae*, responsável pelo declínio de videiras em Santa Catarina.

Dentre as fitoviroses relatadas no país destacam-se: enrolamento da folha (*Grapevine leafroll-associated virus*), mosaico das nervuras (*Grapevine fleck virus*), complexo do lenho rugoso (*Grapevine virus A* e *Grapevine virus B*) e canelura do tronco da videira (*Grapevine rupestris stem pitting-associated*) (Amorim et al., 2016; Basso et al., 2010). Nos parreirais brasileiros, os principais nematoides que parasitam o sistema radicular causando distúrbios, tanto anatômicos, como fisiológicos são os nematoides das galhas (*Meloidogyne javanica* e *M. incognita*), os das lesões (*Pratylenchus brachyurus*, *P. jordanensis* e *P. thornei*) e as espécies conhecidas por nematoides-punhal “dagger nematodes” (*Xiphinema americanum*, *X. brasiliensis*, *X. index* e *X. krugi*) (Campos et al., 2003; Naves, 2005). Dentre as fitobacterioses, apenas duas foram relatadas no país até o presente: a galha da coroa (*Rhizobium radiobacter* e *R. vitis*) e o cancro bacteriano (*Xanthomonas citri* pv. *viticola*), sendo esta última a de maior importância econômica (Tavares et al., 2000; Malavolta Júnior et al., 1999b). No entanto, duas outras bacterioses importantes mundialmente representam ameaças para a viticultura nacional: o Mal de Pierce causado por *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* e a necrose bacteriana por *Xylophilus ampelinus* (Ferreira et al., 2015).

### **3. Cancro bacteriano da videira**

#### **3.1. Histórico e distribuição geográfica**

O cancro bacteriano da videira foi descrito em 1969 na Índia, quando Nayudu (1972) verificou a presença dos sintomas característicos da doença em videiras da variedade Anab-e-

Shahi em parreirais do Colégio Agrícola de Tirupati, no estado de Andhra Pradesh. No Brasil, a doença foi relatada pela primeira vez em 1998, em parreirais da var. RedGlobe no Submédio do Vale do São Francisco, em Petrolina, PE (Lima et al., 1999; Malavolta Júnior et al., 1999b). Na mesma época, a doença também foi detectada nos estados da Bahia e do Piauí (Lima et al., 1999; Malavolta Júnior et al., 1999a). Focos da doença foram posteriormente relatados nos estados do Ceará (Freire & Oliveira, 2001), Goiás (Junqueira et al., 2006), Paraná (Tomaz et al., 2011), Roraima (Halfeld-Vieira & Nechet, 2006) e São Paulo (Rodrigues Neto et al., 2011). Por se tratar de uma doença quarentenária, com distribuição restrita, a erradicação das plantas infectadas foi adotada para evitar a disseminação do patógeno. O *status* atual do agente etiológico da doença é de praga regulamentada, classificada como Praga Quarentenária Presente (PQP), com registro nos estados de PE, BA, CE e RR (MAPA, 2018).

O cancro bacteriano é a doença de maior preocupação entre os viticultores da região do Submédio do Vale do São Francisco, pois além de causar queda na produtividade, impede o trânsito de material propagativo a partir dos estados onde a bactéria é registrada, podendo limitar a exportação de uva para mercados internos e externos (Ferreira et al., 2015).

A ocorrência do cancro bacteriano da videira no mundo é restrita, com relatos na Índia (Nayudu, 1972) e no Brasil (Lima et al., 1999; Malavolta Júnior et al., 1999b). Em 2005, a doença foi relatada na África (Midha & Patil, 2014). O cancro bacteriano da videira representa, portanto, uma ameaça ao cultivo da videira nas Américas, Austrália e Europa.

### **3.2. Sintomatologia**

Os sintomas do cancro bacteriano da videira podem se manifestar em várias partes da planta (Figura 1). Nas folhas, surgem como pontos necróticos (1 a 2 mm de diâmetro) com ou sem halo amarelado, algumas vezes coalescendo e causando a morte de extensas áreas do limbo foliar. Nas nervuras e pecíolos das folhas, bem como nos ramos e ráquis dos frutos, formam-se

manchas escuras alongadas, que evoluem para fissuras longitudinais de coloração negra, conhecidas como cancos (Nayudu, 1972; Lima et al., 1999; Nascimento & Mariano, 2004). Também podem ser observadas necrose nas inflorescências, manchas escuras e alongadas na ráquis dos frutos, desuniformidade e lesões necróticas nas bagas (Lima & Moreira, 2012). A severidade dos sintomas do cancro bacteriano varia de acordo com a variedade de videira. Uvas finas (*V. vinifera*) são mais suscetíveis que uvas comuns (*V. labrusca* e híbridos interespecíficos), com maior incidência e severidade da doença e menor período de incubação (Nascimento et al., 2006).



**Figura 1.** Sintomas do cancro bacteriano da videira causado por *Xanthomonas citri* pv. *viticola*. A. Lesões necróticas no limbo foliar e na nervura; B. Lesões necróticas no pecíolo e nas nervuras; C. Lesões necróticas nas folhas e nos ramos; D. Cancro no ramo; E. Cancro no engajo; F. Lesões necróticas no engajo e na baga. Fotos: Maria Angélica Guimarães Barbosa.

### 3.3. Etiologia

O agente etiológico do cancro bacteriano da videira é classificado dentro do Domínio Bacteria, Classe Gammaproteobacteria, Ordem Xanthomonadales, Família Xanthomonadaceae e Gênero *Xanthomonas* (Garrity et al., 2001). A bactéria foi primeiramente identificada por Nayudu (1972) como *Pseudomonas viticola* sp. nov. e reclassificada por Dye (1978) como *X. campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye. Estudos posteriores, com base em sequências do gene *copA* (Marques, 2007) e do gene *housekeeping gyrB* (Parkinson et al., 2009) e análises genômicas (Midha & Patil, 2014; Bansal et al., 2017) demonstraram uma estreita relação entre a bactéria e *X. citri* pv. *citri*, agente causal do cancro cítrico. Recentemente, com base em análises de perfis de rep-PCR, sequências de genes *housekeeping* (*gyrB*, *rpoD*, *fyuA*, *dnaK*, *atpD*, *efp* e *glnA*) e de patogenicidade (*hrpB*), e análises genômicas, Gama et al. (2018) e Ferreira et al. (2019) concluíram que a bactéria está geneticamente relacionada à espécie *X. citri* e seus patovares. Gama et al. (2018) propuseram a reclassificação de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* como *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 comb. nov.

As células de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Xcv) possuem formato de bastonete com dimensões de 0,6 x 1,2 - 2,5 µm e um flagelo polar (Nayudu, 1972). As colônias são arredondadas e brilhantes com bordos lisos, em meio ágar-nutritivo. Todos os isolados descritos, desse patovar, apresentam coloração creme-esbranquiçada, indicando ausência de produção do pigmento típico das *Xanthomonas*, a xantomonadina. A bactéria é Gram-negativa, oxidativa, não produz pigmentos fluorescentes em meio King's B, não utiliza asparagina como fonte única de carbono e nitrogênio, e apresenta reação positiva para proteólise de amido e gelatina (Nayudu, 1972; Lima et al., 1999; Nascimento & Mariano, 2004). Em meio de cultura líquido NYD, Xcv apresenta crescimento ótimo em temperaturas de 27 a 29 °C, não há crescimento a zero e 40 °C, pH ótimo de 7,5 e decréscimo de crescimento a partir de 3% de NaCl, com concentração letal de 6,0%. (Nascimento et al., 2005).

O sequenciamento de três isolados de Xcv, dois brasileiros (CCRMXCV 80 e CFBP 7764) e o patotipo indiano (LMG 965), revelaram genomas de aproximadamente 5 Mb, com conteúdo de G-C em torno 64% e número de genes variando de 4.578 a 4.916 (Midha & Patil, 2014; Lima et al., 2017; Ferreira et al., 2019).

Análises realizadas por meio de rep-PCR indicaram a existência de baixa variabilidade genética entre isolados brasileiros de Xcv (Trindade et al., 2005; Marques, 2007; Gama, 2014; Gama et al., 2018). Trindade et al. (2005) analisando os padrões obtidos com os *primers* REP, ERIC e BOX, observaram a formação de cinco subgrupos ao nível de 68% de similaridade entre 40 isolados brasileiros. Em outro estudo, Marques (2007) observou a formação de cinco subgrupos a 70% de similaridade entre 32 isolados testados. Em ambos os trabalhos, perfis genômicos apresentaram bandas monomórficas com potencial para uso em diagnóstico, no entanto não foi possível correlacionar o polimorfismo observado entre os isolados brasileiros com variedade de origem, local ou época de coleta. Em trabalhos mais recentes, foi caracterizado uma coleção maior de isolados brasileiros quanto à variabilidade metabólica, epidemiológica e molecular, por meio de testes fenotípicos, componentes epidemiológicos e rep-PCR, respectivamente. Os isolados formaram um grupo homogêneo com alta similaridade metabólica e similaridade acima de 88% entre perfis de rep-PCR. Adicionalmente, elevada variabilidade intrapatovar foi detectada quanto à agressividade em videira, quantificada pelos componentes epidemiológicos, período de incubação e severidade (Gama, 2014; Gama et al., 2018) e por marcadores microssatélites derivados de oito *loci* do genoma de *X. citri* pv. *citri* (306) (Ferreira et al., 2019).

### 3.4. Diagnose

A diagnose do cancro bacteriano da videira pode ser realizada com base na avaliação dos sintomas, isolamento em meio de cultura, realização de testes bioquímicos, testes de patogenicidade em videira e teste de hipersensibilidade em folhas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. 'Santa Clara') (Ferreira et al., 2015). O isolamento de Xcv de tecidos vegetais infectados é dificultado pela presença de contaminantes bacterianos, entre os quais *Microbacterium barkeri*. A fim de solucionar esse problema, Peixoto et al. (2006) desenvolveram o meio semi-seletivo NYDAM, usado para isolamento da bactéria a partir de infecções naturais em campo.

Devido às limitações, em função do tempo gasto, laboriosidade dos métodos tradicionais e dificuldade de adequação à detecção em material assintomático, protocolos baseados em métodos sorológicos e moleculares foram desenvolvidos.

Araújo et al. (2005) desenvolveram dois anticorpos policlonais (AC 4558 e AC 4560) com limiar de detecção de  $10^4$  UFC ml<sup>-1</sup>, pelo método ELISA indireto, mas com especificidade limitada, ou seja, ocorreram reações cruzadas com os patovares *vesicatoria*, *campestris* e *mangiferaeindicae*.

Trindade et al. (2007) desenvolveram um protocolo baseado em PCR utilizando os pares de *primers* Xcv1F/Xcv3R e RST2/Xcv3R, os quais amplificam uma sequência parcial do gene *hrpB*, que codifica uma das proteínas do sistema de secreção tipo III. Esses *primers* foram testados quanto à especificidade e sensibilidade. Para os dois pares, a amplificação foi positiva com o DNA de 44 isolados de Xcv, mas também com isolados dos patovares *mangiferaeindicae* e *passiflorae*. Contudo, a digestão dos produtos de PCR com a enzima de restrição *Hae* III, permitiu diferenciar o patovar *viticola* desses patovares. A sensibilidade dos *primers* Xcv1F/Xcv3R e RST2/Xcv3R foi de 10 pg e 1 pg de DNA purificado, respectivamente. O limiar de detecção de RST2/Xcv3R foi de  $10^4$  UFC ml<sup>-1</sup>, mas empregando-se uma segunda

rodada de amplificação com o primer interno Xcv1F (Nested-PCR), esse limiar foi reduzido para  $10^2$  UFC ml<sup>-1</sup>.

Freitas (2012) comparou os métodos de BIO-PCR e Nested-PCR para a detecção de Xcv, utilizando os mesmos *primers* descritos por Trindade et al. (2007). O limiar de detecção de Xcv por BIO-PCR e Nested-PCR foi determinado com a pulverização de Xcv em frutos e folhas de videira em concentrações crescentes de  $10^2$  a  $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>, seguido de lavagem dos tecidos inoculados. O limiar de detecção por BIO-PCR em frutos e folhas foi de  $10^2$  UFC ml<sup>-1</sup>. Com a Nested-PCR o limiar de detecção em  $10^2$  UFC ml<sup>-1</sup> e de  $10^3$  UFC ml<sup>-1</sup> para frutos e folhas, respectivamente. Na validação dos protocolos de detecção, utilizando esses métodos, em áreas de produção com histórico da doença em Petrolina, PE, a BIO-PCR foi mais eficiente. Entre as amostras com sintomas, 97% foram positivas por BIO-PCR e 69,7% positivas por Nested-PCR. Das amostras sem sintomas, 30% foram positivas por BIO-PCR, mas nenhuma delas foi positiva por Nested-PCR, sem o enriquecimento prévio em meio de cultura. Em amostras de folhas de mudas de videira assintomáticas, coletadas em dois viveiros, um localizado em Petrolina, PE e o outro em Curaçá, BA, a presença de Xcv foi detectada por BIO-PCR em 5% das amostras, no entanto, nenhuma dessas três amostras foi positiva por Nested-PCR.

### **3.5. Ciclo da doença e condições favoráveis**

Na ausência de condições ideais para infecção, Xcv pode sobreviver em cancos formados em órgãos de parte aérea e epifiticamente em folhas de videira (Araújo, 2001). Silva et al. (2012) relataram que a bactéria também é capaz de sobreviver em altas populações, por até 80 dias, em tecidos de videira infectados na superfície do solo. Além de infectar a videira, infecção natural foi observada na Índia em plantas de *Azadirachta indica* (neem) e *Phyllanthus maderaspatensis* (Nayudu, 1972). Infecção natural também foi confirmada em plantas

invasoras de *Alternanthera tenella*, *Amaranthus* sp., *Glycine* sp. e *Senna obtusifolia*, coletadas em parreirais de Juazeiro e Petrolina, no Submédio do Vale do São Francisco, com sintomas similares aos do cancro bacteriano em videira (Peixoto et al., 2007). Por inoculação artificial, Xcv foi capaz de infectar e causar sintomas em plantas da família Anacardiaceae, como *Mangifera indica*, *Anacardium occidentale*, *Spondias tuberosa*, *S. dulcis*, e *Schinus terebenthifolius* (Araújo & Robbs, 2000), além de outras plantas pertencentes a diferentes famílias botânicas, como *Pilea* sp. (Urticaceae), *Chamaesyce hirta* (Euphorbiaceae), *Eragrostis pilosa*, *Dactyloctenium aegyptium* (Poaceae) (Peixoto et al., 2007), *Glycine* sp., *S. obtusifolia*, *Desmodium discolor*, *Vigna unguiculata* (Fabaceae), *A. deflexus* (Amaranthaceae), *A. indica* (Meliaceae) e *Solanum lycopersicum* (Solanaceae) (Santos et al., 2014), sugerindo o papel dessas plantas como hospedeiras alternativas da bactéria.

O principal meio de disseminação da doença a longas distância é por material propagativo infectado. Dentro do campo a disseminação da bactéria se dá por meio de restos de cultura infectados espalhados pelo pomar ou aderidos em roupas, veículos, contentores, tesouras, canivetes e luvas não desinfestadas utilizadas em podas, raleio e colheita de frutos em plantas infectadas (Lima, 2008; Nascimento & Mariano, 2004; Naue et al., 2014b).

A penetração da Xcv pode ocorrer por meio de aberturas naturais (Robbs & Rodrigues Neto, 1999). Entretanto todos os agentes de ferimentos são importantes para a penetração de bactéria, destacando-se os tratos culturais e ventos fortes (Nascimento & Mariano, 2004). Araújo et al. (2004), investigando a colonização de tecidos de videira por Xcv, observaram que a bactéria se multiplica nos espaços intercelulares, coloniza o parênquima e, a partir deste, os feixes vasculares do xilema e floema. Tostes et al. (2014) constataram a associação da bactéria com sementes e bagas de uva da variedade Red Globe, confirmando a natureza sistêmica da colonização.



De acordo com o trabalho de Chand & Kishun (1990), citado por Nascimento & Mariano (2004), temperaturas em torno de 25 a 30 °C e alta umidade relativa do ar proporcionam condições favoráveis ao desenvolvimento do patógeno. Conceição et al. (2017) observaram sob condições controladas que o incremento da temperatura em 5,8 °C, ou seja, um aumento da temperatura do ambiente de 26,0 °C para 31,8 °C, reduziu significativamente o período de incubação do cancro bacteriano em quatro variedades de videira.

### **3.6. Controle**

Tratando-se de uma doença causada por uma bactéria quarentenária presente, medidas regulatórias devem ser adotadas no sentido de evitar que o patógeno se dissemine para regiões de cultivo de videira, como a Região Sul, principal produtora de uva do país. Assim deve-se adotar medidas baseadas no princípio da exclusão, sendo a principal, o uso de material de propagação certificado. A regulamentação fitossanitária, através de ordem legislativa também é uma importante medida de exclusão. Devido aos riscos da introdução e disseminação de Xcv em regiões do país onde a bactéria não ocorre, foi publicada a Instrução Normativa MAPA 2/2014 de 6 de fevereiro de 2014, a qual estabelece medidas a serem adotadas para prevenção, controle e erradicação do agente etiológico do cancro bacteriano da videira (MAPA, 2014).

Em áreas de ocorrência de Xcv as medidas recomendadas de controle são: estabelecimento de quebra ventos, desinfestação de implementos, equipamentos e materiais de poda e colheita, remoção e queima de todo resto de poda e material com sintomas, inspeções periódicas nos parreirais e eliminação de possíveis hospedeiros alternativos do patógeno (Nascimento & Mariano, 2004). A principal medida de controle utilizada por produtores no Submédio do Vale do São Francisco é evitar a poda de produção durante o período chuvoso, época em que o clima é favorável para disseminação de Xcv (Barbosa et al., 2016). O controle químico com produtos à base de cobre também é realizado por meio de pulverizações, logo após podas, brotações ou

quando há ocorrência de ferimentos. No entanto, o uso indiscriminado de cúpricos pode levar à seleção de isolados resistentes, pois isolados de Xcv apresentam variabilidade na tolerância a cobre (Marques et al., 2009).

O uso de resistência genética é o método mais eficiente para o controle de doenças. Diversos trabalhos foram realizados com o objetivo de determinar os níveis de resistência de variedades de videira a Xcv, por meio de inoculações artificiais. Nesses trabalhos os autores observaram que acessos de *V. vinifera* foram os mais suscetíveis quando comparados a outras espécies e híbridos de *Vitis* (Malavolta Júnior et al., 2003; Nascimento et al., 2006; Zucal et al., 2016). Na Índia, Chand (1992) observou que entre as variedades de *V. vinifera* avaliadas, as sem sementes foram mais suscetíveis comparadas às com sementes. Entre as variedades sem sementes, as coloridas mostraram-se mais suscetíveis que as brancas. No entanto, Klambe et al. (2017) observaram que entre os acessos de *V. vinifera* testados, os que produzem bagas brancas e sem sementes foram suscetíveis ou altamente suscetíveis, enquanto os de bagas coloridas e com sementes foram mais resistentes. Ainda dentro do princípio da resistência, Lima et al. (2017) avaliaram o efeito dos indutores de resistência, *Saccharomyces cerevisiae*, acibenzolar-S-methyl, ácidos orgânicos e polifenóis e silicato de potássio na proteção de mudas de videira da variedade Red Globe à Xcv. Os autores observaram que plantas pulverizadas com acibenzolar-S-Methyl na concentração mínima de 3g 100 l<sup>-1</sup>, 15 dias antes da inoculação de Xcv, apresentaram significativa redução na incidência, severidade e área abaixo da curva de progresso do cancro bacteriano da videira e elevação da atividade enzimática de  $\beta$ -1,3 glucanases e fenilalanina amônia-liase, indicando haver influência na indução de resistência das plantas a doença.

Além dos trabalhos visando a resistência genética, estudos foram realizados para obtenção de métodos eficazes na erradicação de Xcv. Silva et al. (2012) verificaram que a compostagem por 10 dias foi capaz de eliminar Xcv em restos de poda infectados. Silva et al.

(2013) testaram o efeito da limpeza clonal e da termoterapia na eliminação de Xcv em mudas infectadas. Os autores verificaram que o cultivo de explantes com três e 10 mm em meio sem antibiótico e com cefotaxima (300 mg l<sup>-1</sup>), respectivamente, possibilitaram a obtenção de plantas livres da bactéria, mas a termoterapia de mudas infectadas, associada ao cultivo *in vitro*, não foi capaz eliminar o patógeno. Sabendo-se que o material propagativo contaminado é a principal forma de disseminação de Xcv, Naue et al. (2014a) avaliaram a eficiência da termoterapia (50 °C por 30 e 40 min; 53 °C por 5 e 10 min), de bactericidas (oxitetraciclina + sulfato de cobre e oxitetraciclina) e sanitizantes (cloreto de dodecildimetil amônio, hipoclorito de sódio e cloreto de benzalcônio) no tratamentos de bacelos de videira. Como resultado, nenhum dos tratamentos foi eficiente na erradicação de Xcv. Outra importante forma de disseminação de Xcv, principalmente dentro de um parreiral, é o uso de ferramentas e utensílios contaminados durante operações de poda, raleio e colheita, Naue et al. (2014b) verificaram que Xcv pode sobreviver por 24 h em tesouras de raleio e pode ser transmitida até o 24º corte após a contaminação. Neste sentido, os autores também verificaram a eficiência de produtos na desinfecção de tesouras de raleio e de água para produção de mudas de videira. Os sanitizantes hipoclorito de sódio (20.000 ppm) e cloreto de dodecil dimetilamônio (1.140 ppm) foram 100% eficientes na desinfestação das tesouras contaminadas e mantiveram a eficácia por 8 h. A desinfecção total da água foi obtida pelo uso de dodecil dimetilamônio (570 ppm), hipoclorito de sódio (5.000 ppm) e cloreto de benzalcônio (122,5 ppm).

Estudos *in vitro* também foram realizados com o objetivo de avaliar a eficácia de produtos químicos, óleos essenciais e agentes de controle biológico, no crescimento de Xcv. Jambenal et al. (2011) observaram que dentre os produtos químicos testados, a combinação de estreptomicina (500 ppm) com oxicleto de cobre (2000 ppm) foi o tratamento que ocasionou maior inibição do crescimento de Xcv. Entre os agentes de controle biológico, *Bacillus subtilis* foi o que apresentou maior potencial antagonista. Santos et al. (2014) observaram que óleos

essenciais de *Lippia gracilis*, em três diferentes dosagens (200, 250 e 300  $\mu\text{L l}^{-1}$ ), proporcionam significativa redução no crescimento de Xcv, sendo superiores ao oxiclreto de cobre.

#### 4. JUSTIFICATIVA

O cancro bacteriano da videira, causado por Xcv, é uma das doenças de maior preocupação fitossanitária no Submédio do Vale do São Francisco, sendo responsável por danos severos e representando alto potencial de risco ao desenvolvimento da viticultura nacional (Gama et al., 2018). Devido aos danos causados e sua ocorrência restrita, a bactéria é regulamentada como uma Praga Quarentenária Presente (MAPA, 2018).

No Brasil a cultura da videira encontra-se em expansão para outras regiões sem tradição da viticultura, como estados da região centro-oeste (Distrito Federal, Goiás e Mato Grosso (IBGE, 2018). Assim o uso de material propagativo certificado é imprescindível para evitar a disseminação de patógenos da cultura. Nesse contexto, há uma demanda para o desenvolvimento de protocolos para detecção específica, sensível e rápida de Xcv em plantas assintomáticas. Embora os protocolos já desenvolvidos mostrem potencial para a detecção de Xcv em material assintomático, os *primers* usados apresentaram limitações quanto à especificidade. Além disso, o número de etapas necessárias para a execução da BIO-PCR e os procedimentos pós amplificação tornam o processo pouco prático e inadequado para um grande número de amostras.

Além de Xcv infectar videira, existem relatos de infecção natural em outras plantas de diferentes espécies e famílias botânicas (Nayudu, 1972; Peixoto et al., 2007, Santos et al., 2014). Plantas hospedeiras alternativas são importantes na sobrevivência de diversos fitopatógenos (Gonçalves et al., 2017; Ocimati et al., 2018). No entanto, não existem, na literatura, estudos relacionados à colonização, sobrevivência, e translocação vascular de Xcv em hospedeiras alternativas.

O estudo da diversidade genética tem sido usado para compreensão da interação planta-patógeno e da história evolutiva de diversas espécies de *Xanthomonas*, além de fornecer subsídios para o controle e diagnóstico de doenças causados por esses fitopatógenos (Gillings et al., 2005; Rademaker et al., 2005; Valverde *et al.*, 2007; Jaciani et al., 2012; Hajri et al., 2012; Lange *et al.*, 2016; López-Soriano *et al.*, 2016). Embora estudos da caracterização da diversidade genética de isolados brasileiros de Xcv por rep-PCR (Trindade et al., 2005; Marques, 2007), análise de microssatélites (*multilocus variable number of tandem repeats analysis* - MLVA) (Ferreira et al., 2019), sensibilidade/tolerância ao cobre (Marques et al., 2009) e caracterização polifásica (variabilidade metabólica, molecular e epidemiológica) (Gama, 2014; Gama et al., 2018) tenham sido realizados, não é conhecida a diversidade de genes efetores do tipo III (T3Es), entre os isolados brasileiros e em relação ao patotipo da Índia, nem se o repertório de efetores está relacionado à habilidade de infectar outras plantas, além de videira, ou à agressividade de isolados desse patovar em videira.

## 5. OBJETIVOS

Considerando o exposto acima, os objetivos centrais do presente estudo foram estabelecer protocolos para detecção molecular específica, sensível e rápida de Xcv em videiras assintomáticas, investigar aspectos da interação entre a bactéria e a hospedeira alternativa natural, *Senna obtusifolia*, e espécies da família Amaranthaceae e caracterizar o repertório de genes T3Es em uma coleção de isolados do patógeno.

### Os objetivos específicos foram:

1. Desenhar e selecionar *primers* específicos para a detecção de Xcv por PCR convencional (cPCR) e PCR em tempo real (qPCR);

2. Desenvolver e validar protocolos de detecção de Xcv, por cPCR e qPCR, em amostras de videira assintomáticas coletadas em áreas de ocorrência do cancro bacteriano;
3. Investigar aspectos da interação entre Xcv e a hospedeira alternativa natural, *Senna obtusifolia*, e plantas da família Amaranthaceae, relativos à expressão de sintomas, colonização, sobrevivência e translocação vascular.
4. Analisar *in silico* a diversidade de repertório de genes T3Es em patovares de *Xanthomonas citri* e determinar seu papel na estrutura populacional de acordo com a gama de hospedeiros;
5. Determinar por PCR o repertório de genes T3Es em uma coleção de isolados brasileiros de Xcv;
6. Quantificar a virulência de isolados em variedade de videira suscetível e correlacionar com o repertório de genes T3Es;

## 6. REFERÊNCIAS

- Amorim, L., Spósito, M. B., & Kuniyuki, H. (2016). Doenças da Videira. (In: L. Amorim, J.A.M., Rezende, A. Bergamin Filho, & L. F. A. Camargo (Eds.), *Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas* (pp. 745-758). Piracicaba: Agronômica Ceres.)
- Araújo, J. S. P., Oliveira, B. C., Olivares F. L., Reis Júnior, F. B., Cruz, G. B., Robbs, C. F., & Ribeiro, R. L. D. (2004). Imunomarcagem de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* com ouro utilizando anticorpos policlonais. *Agronomia*, 38, 29-33.
- Araújo, J. S. P., & Robbs, C. F. (2000). Sintomatologia, patogenicidade e controle do cancro bacteriano da videira (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*) no Brasil. *Agronomia*, 34, 83-86.
- Araújo, J. S. P. (2001). Perfil epidemiológico e subsídios para o controle de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, agente do cancro bacteriano da videira (*Vitis vinifera*) no Brasil. Tese Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil.
- Araújo, J. S. P., Reis Júnior, F. B., Cruz, G. B., Oliveira, B. C., Robbs, C. F., Ribeiro, R. L. D., & Polidoro, J. C. (2005). Produção e caracterização de anticorpos policlonais contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40, 305-309.
- Bansal, K., Midha, S., Kumar, S., & Patil, P. B. (2017). Ecological and evolutionary insights into *Xanthomonas citri* pathovar diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 83, e02993-16.
- Barbosa, M. A. G., Freitas, D. M. S., Ribeiro Júnior, P. M., & Batista, D. C. (2016). Doenças da videira. *Informe Agropecuário*, 37, 86-98.

- Barbosa, M. A. G., Ribeiro Júnior, P. M., & Batista, D. C. (2016). Manejo do cancro bacteriano da videira no Vale do São Francisco. (In: M. A. S. Gama, A. Nicoli, L. M. P. Guimarães, & U. P. Lopes (Eds.), *Estado da Arte em Fitobacterioses Tropicais* (pp. 229-242). Recife: EDUFRPE.)
- Basso, M. F., Fajardo, T. V. M., Eiras, M., Ayub, R. A., & Nickel, O. (2010). Detecção e identificação molecular de vírus associados a videiras sintomáticas e assintomáticas. *Ciência Rural*, 40, 2249-2255.
- Campos, V. P., Maximiniano, C., Ferreira, E. A. (2003). Doenças causadas por nematoides em videira. (In: T. V. M. Fajardo (Ed.), *Uva para processamento: Fitossanidade* (pp. 72-81). Brasília: Embrapa Informação Tecnológica.)
- Canale, M. C., Nesi, C. N., Falkenbach, B. R., DA SILVA, C. A. H., & Brugnara, E. C. (2019). *Pleurostomophora richardsiae* associated with olive tree and grapevine decline in Southern Brazil. *Phytopathologia Mediterranea*, 58, 201-205.
- Chand, R., & Kishun, R. (1990). Effect of temperature on the growth of grape vine bacterial pathogen. *Drakshavritta Souvenir*, 73, 5.
- Chand, R. (1992). Sources of resistance to grapevine bacterial canker disease in *Vitis*. *Vitis*, 31, 83-86.
- Conceição, J. L. A., Angelotti, F., Peixoto, A. R., & Ghini, R. (2017). Infection by *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* under temperature increase and carbon dioxide concentrations. *Comunicata Scientiae*, 8, 214-220.
- Dye, D.W. (1978). Genus *Xanthomonas* Dowson 1939. In: Young, J. M., Bradbury J. F., Panagopoulos, C. G. & Robbs, C. F. (eds.) A proposed nomenclature and classification for pathogenic bacteria. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 21, 153-177.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2017. FAOSTAT: Food and agriculture data. <http://www.fao.org/faostat/en/#data> . Consultado em: 13/01/2019.



- Ferreira, M. A. S. V., Bonneau, S., Briand, M., Cesbron, S., Portier, P., Darrasse, A., Gama, M. A. S., Barbosa, M. A. G., Mariano, R. L. R., Souza, E. B., & Jacques M-A. (2019). *Xanthomonas citri* pv. *viticola* affecting grapevine in Brazil: emergence of a successful monomorphic pathogen. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 489.
- Ferreira, M. A. S. V., Stefanelo, D. R., & Villela, J. G. A. (2015). Doenças emergentes e quarentenárias da videira. (In: Núcleo de Estudos em Fitopatologia (Org.), *Avanços da fitopatologia no agronegócio* (pp. 107-133). Lavras: UFLA.)
- Freire, F.C.O., & Oliveira, A.D.S. (2001). *Ocorrência do cancro bacteriano da videira no estado do Ceará*. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. (Comunicado Técnico, 62).
- Freitas, A. C. (2012). Detecção molecular de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videiras assintomáticas. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.
- Gama, M. A. S., Mariano, R. L. R., Silva Júnior, W. J., Farias, A. R. G., Barbosa, M. A. G., Ferreira, M. A. S. V., Costa Júnior, C. R. L., Santos, L. A., & Souza, E. B. (2018). Taxonomic repositioning of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 as *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 comb. nov. and emendation of the description of *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* to include pigmented isolates pathogenic to cashew plant. *Phytopathology*, *108*, 1143-1153.
- Gama, M. A. S. (2014). Variabilidade de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, agente do cancro bacteriano da videira. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, Brasil.
- Garrido, L. R., & Gava, R. (2014). *Manual de doenças fúngicas da videira*. (Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho)
- Garrity, G. M., Winters, M., & Searles, D. B. (2001). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. (New York: Springer)

- Gillings, M.R., Holley, M.P., Stokes, H.W., & Holmes, A.J. (2005). Integrons in *Xanthomonas*: a source of species genome diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*, *102*, 4419-4424.
- Gonçalves, R. M., Schipanski, C. A., Kogushi, L., Soman, J. M., Sakate, R. K., Silva Júnior, T. A. F., & Maringoni, A. C. (2016). Alternative hosts of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, causal agent of bean bacterial wilt. *European Journal of Plant Pathology*, *148*, 357-365.
- Halfeld-Vieira, B. A., & Nechet, L. K. (2006). Bacterial canker of grapevine in Roraima, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, *31*, 604.
- Hajri, A., Pothier, J. F., Fischer-Le Saux, M., Bonneau, S., Poussier, S., Boureau, T., & Manceau, C. (2012). Type three effector genes distribution and sequence analysis provides new insights into pathogenicity of plant pathogenic *Xanthomonas arboricola*. *Applied and Environmental Microbiology*, *AEM*, 06119.
- IBGE. 2018. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>. Consultado em 10/01/2019.
- ITIS - Integrated Taxonomic Information System. 2011. Vitaceae of North America. [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=28606#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=28606#null). Consultado em 21/01/2019.
- Jaciani, F. J., Ferro, J. A., Ferro, M. I. T., Vernière, C., Pruvost, O., & Belasque Júnior, J. (2012). Genetic diversity of a Brazilian strain collection of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* based on the type III effector protein genes. *Plant Disease*, *96*, 193-203.
- Jambenal, S., Ravikumar, M. R., & Hiremani, N. (2011). Basic studies on *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* causing bacterial leaf spot of grape and evaluated *in-vitro* efficacy of different chemicals and bioagents against its growth. *International Journal Plant Protection*, *4*, 397-401.

- Junqueira, N. T. V., Junqueira, K. P., Braga, M. F., Vaz, C. F., Santos, E. C., Junqueira, L. P., Souza, L. S., & Lima, C. A. (2006). Ocorrência do cancro bacteriano da videira na região do entorno do Distrito Federal. (In: XIX Congresso Brasileiro De Fruticultura (p. 323). Cabo Frio, RJ: SBF/UENF/UFRRJ.)
- Kamble, A. K., Sawant, S. D., Saha, S., & Sawant, I. S. (2017). Screening of Grapevine Germplasm to Identify Sources of Resistance to Bacterial Leaf Spot Causing *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, 5, 834-837.
- Lange, H.W., Tancos, M.A., Carlson, M.O., & Smart, C.D. (2016). Diversity of *Xanthomonas campestris* isolates from symptomatic crucifers in New York State. *Phytopathology*, 106, 113-122.
- Lazzarotto, J. J., & Fioravanço J. C. (2013). Tendências e sazonalidades nas exportações e importações brasileiras de uva de mesa. *Informações Econômicas*, 43, 43-58.
- Lima, N. B., Gama M. A. S., Mariano, R. L. R., Silva Júnior. W. J., Farias, A. R. G., Falcão, R. M., Sousa-Paula L. C., Benko-Iseppon, A. M., Paiva Júnior, S. S. L., Balbino, V. Q. & Souza, E. B. (2017). Complete genome sequence of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* strain CCRMXCV 80 from Brazil. *Genome Announcements*, 5, e01263-17
- Lima, M. F. (2008). Doenças que comprometem a produção e a comercialização da uva. (In: I Simpósio Internacional de Vitivinicultura do Submédio São Francisco (pp.13-14). Petrolina: Embrapa Semiárido.)
- Lima, M. F., Ferreira, M. A. S. V., Moreira, A. W., & Dianese, J.C. (1999). Bacterial canker of grapevine in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 24, 440-443.
- Lima, M.F., & Moreira, F. R. B. (2012). *Uva de mesa: fitossanidade*. (Brasília: Embrapa).

- Lima, M. A. G., Peixoto, A. R., Borges, I. V., Silva, M. S., Barbosa, M. A. G., & Cavalcanti, L. S. (2017). Induction of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* in grapevine plants. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 39, 669.
- López-Soriano, P., Boyer, K., Cesbron, S., Morente, M.C., Peñalver, J., Palacio-Bielsa, A., Vernière C., López, M.M., & Pruvost, O. (2016). Multilocus variable number of tandem repeat analysis reveals multiple introductions in Spain of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, the causal agent of bacterial spot disease of stone fruits and almond. *PLoS one* 11, e0163729.
- Malavolta Júnior, V. A., Almeida, I. M. G., Sugimori, M. H., Ribeiro I. J. A., Rodrigues Neto, J., Pires, E. J. P., & Nogueira, E. M. C. (1999a). *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videira no Estado do Piauí. *Summa Phytopathologica*, 25, 27.
- Malavolta Júnior, V.A., Almeida, I. M. G., Sugimori, M. H., Ribeiro, I. J. A., Rodrigues Neto, J., Pires, E. J. P., & Nogueira, E. M. C. (1999b). Ocorrência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videira no Brasil. *Summa Phytopathologica* 25, 26-27.
- Malavolta Júnior, V. A., Sugimori, M. H., Almeida, I. M. G., & Ribeiro, I. J. A. (2003). Resistência de variedades de videira a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Arquivo do Instituto Biológico*, 70, 373-376.
- MAPA (2018). Instrução Normativa nº 38, de 1º de outubro de 2018. <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=02/10/2018&jornal=515&pagina=14&totalArquivos=104>. Consultado em 23/06/2018.
- Marques, E. (2007). Variabilidade e tolerância ao cobre em *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, agente causal do cancro bacteriano da videira (*Vitis* spp.). Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. Brasília, Brasil.
- Marques, E., Uesugi, C. H., & Ferreira, M. A. S. V. (2009). Sensitivity to copper in *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Tropical Plant Pathology*, 34, 406-411.

- Mello, L. M. R. (2018). *Vitivinicultura brasileira: panorama 2017*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. (Comunicado Técnico, 2017)
- Midha, S., & Patil, P. B. (2014). Genomic insights into the evolutionary origin of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and its ecological relatives. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*, 6266-6279.
- Nascimento, A. R. P., Mariano, R. L. R., & Gama, M. A. S. (2005). Métodos de preservação e crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em meio de cultura variando temperatura, pH e concentração de NaCl. *Fitopatologia Brasileira*, *30*, 650-654.
- Nascimento, A. R. P., & Mariano, R. L. R. (2004). Cancro bacteriano da videira: etiologia, epidemiologia e medidas de controle. *Ciência Rural*, *34*, 301-307.
- Nascimento, A. R. P., Michereff, S. J., Mariano, R. L. R., & Viana, I. O. (2006). Reação de clones de videira a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, baseada nos componentes epidemiológicos do cancro bacteriano. *Ciência Rural*, *36*, 1-7.
- Naue, C. R., Barbosa, M. A. G., Batista, D. C., Souza, E. B., & Mariano, R. L. R. (2014a). Efeito do tratamento de bacelos de videira 'Red Globe' no controle do cancro bacteriano causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, *36*, 853-865.
- Naue, C. R., Costa, V. S. O., Barbosa, M. A. G., Batista, D. C., Souza, E. B., & Mariano, R. L. R. (2014b). *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* on grapevine cutting tools and water: survival and disinfection. *Journal of Plant Pathology*, *96*, 451-458.
- Naves, R. L. (2005). *Diagnose e manejo de doenças causadas por fitonematóides na cultura da videira*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. (Circular Técnica, 57).
- Nayudu, M. V. (1972). *Pseudomonas viticola* sp. nov., incitant of a new bacterial disease of grapevine. *Phytopathologische Zeitschrift*, *73*, 183-186.

- Ocimati, W., Were, E., Groot, J. C. J., Tiftonell, P., Nakato, G. V., & Blomme, G. (2018). Risks posed by intercrops and weeds as alternative hosts to *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* in banana fields. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 1471.
- OIV - International organization of vine and wine. 2017. Distribution of the world's grapevine varieties. <http://www.oiv.int/public/medias/5888/en-distribution-of-the-worlds-grapevine-varieties.pdf>. Consultado em: 21/01/2019.
- Parkinson, N., Cowie, C., Heeney, J., & Stead, D. (2009). Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *59*, 264-274.
- Peixoto, A. R., Mariano, R. L. R., & Viana, I.O. (2006). Semi-selective medium for isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Ciência Rural*, *36*, 1317-1320.
- Peixoto, A. R., Mariano, R. L. R., Moreira, J. O. T., & Viana, I. O. (2007). Hospedeiros alternativos de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Fitopatologia Brasileira*, *32*, 161-164.
- Rademaker, J. L. W., Louws, F. J., Schultz, M. H., Rossbach, U., Vauterin, L., Swings, J., & De Bruijn, F. J. (2005). A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. *Phytopathology*, *95*, 1098–1111.
- Reisch, B. J., & Pratt, C. (1996). Grapes. (In: J. Janick, & J. N. Moore (Eds.) *Fruit breeding: vine and small fruits*. (pp. 297-386). New York: John Willey.)
- Robbs, C. F. & Rodrigues Neto, J. (1999). Enfermidades causadas por bactérias em fruteiras tropicais no Brasil. *Summa Phytopathologica*, *25*, 73-76.
- Rodrigues Neto, J., Destéfano, S. A. L., Rodrigues, L. M. R., Pelloso, D. S., & Oliveira Júnior, L.C. (2011). Grapevine bacterial canker in the State of São Paulo, Brazil: detection and eradication. *Tropical Plant Pathology*, *36*, 42-44.

- Santos, M. M., Peixoto, A. R., Pessoa, E. S., Gama, M. A., Mariano, R. M. R., Barbosa, M. A. G., & Paz, C. D. (2014). Identificação de potenciais plantas hospedeiras alternativas de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Ciência Rural*, *44*, 595-598.
- Santos, M. M., Peixoto, A. R., Pessoa, E. S., Nepa, H. B. S., Paz, C. D., & Souza, A. V. V. (2014). Studies of chemical compounds and antibacterial activity of the essential oil from *Lippia gracilis* against *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* "in vitro". *Summa Phytopathologica*, *40*, 277-280.
- Silva, A. M. F., Melo, N. F., Souza, E. B., Coelho, A. K., & Mariano, R. L. R. (2013). Limpeza clonal de mudas de videira infectadas por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, *35*, 316-319.
- Silva, A. M. F., Menezes, E. F., Souza, E. B., Melo, N. F., & Mariano, R. L. R. (2012). Sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em tecido infectado de videira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, *34*, 757-765.
- Silva, P. C. G., & Correia, R. C. (2010). Caracterização social e econômica da videira. (In: P. C. S. Leão (Ed.), *Cultivo da videira*. Petrolina: Embrapa Semiárido.)
- Sousa, J. S. I. (1996). *Uvas para o Brasil*. (Piracicaba: Fealq). 791p.
- Tavares, S. C. C. H., Lima, M. F., & Melo, N. F. (2000). Principais doenças da videira e alternativas de controle. (In: P. C. S. Leão, & J. M. Soares (Eds.), *A viticultura no Semiárido brasileiro* (pp. 293-346). Brasília: Embrapa.)
- Tomaz, R., Scremin, R. M., Ferreira, M. A. S. V., & Barbosa M. A. G. (2011). Detecção e erradicação de videiras com sintomas do cancro bacteriano no Estado do Paraná. *Tropical Plant Pathology*, *36*, 136.
- Tostes, G. O., Araújo, J. S. P., Farias, A. R. G., Frade, D. A. R., & Olivares, F. L. (2014). Detection and cellular localization of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* in seeds of commercial 'Red Globe' grapes. *Tropical Plant Pathology*, *39*, 134-140.

- Trindade, L. C., Lima, M. F., & Ferreira, M. A. S. V. (2005). Molecular characterization of Brazilian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* by rep-PCR fingerprinting. *Fitopatologia Brasileira*, 30, 46-54.
- Trindade, L. C., Marques, E., Lopes, D. B. & Ferreira, M. A. S. V. (2007). Development of a molecular method for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Summa Phytopathologica*, 33, 16-23.
- Valverde, A., Hubert, T., Stolov, A., Dagar, A., Kopelowitz, J., & Burdman, S. (2007). Assessment of genetic diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates from Israel by various DNA fingerprinting techniques. *Plant Pathology*, 56, 17-25.
- Zucal, M. P. M., Peixoto, A. R., Angelotti, F., da Paz, C. D., Pais, A. K. L., Silva, M. S., Gois, A., & Santos Neta, H. B. (2016). Reação de genótipos de videira ao cancro bacteriano. *Interciencia* 41, 639-645.



# CAPÍTULO 2

---

**Detecção de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* em videiras por PCR em tempo real e BIO-PCR com *primers* desenhados a partir de sequências de genes de patogenicidade e da xantomonadina**

\* Capítulo publicado: Villela, J. G. A., Ritschel, P., Barbosa, M. A. G., Baccin, K. M., Rossato, M., Maia, J. D., & Ferreira, M. A. S V. (2019). Detection of *Xanthomonas citri* pv. *viticola* on grapevine by real-time PCR and BIO-PCR using primers designed from pathogenicity and xanthomonadin gene sequences. *European Journal of Plant Pathology*, 1-15.

## **Detecção de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* em videiras por PCR em tempo real e BIO-PCR com *primers* desenhados a partir de sequências de genes de patogenicidade e da xantomonadina**

### **RESUMO**

*Xanthomonas citri* pv. *viticola* [= *X. campestris* pv. *viticola* (Xcv)], agente causal do cancro bacteriano da videira, foi detectada no Brasil em Petrolina, PE em 1998 e trata-se de uma Praga Quarentenária Presente conforme a legislação vigente. Com o objetivo de melhorar a especificidade, a sensibilidade e a rapidez na detecção de Xcv em videiras assintomáticas, foram selecionados dois novos pares de *primers* tendo como alvos sequências do gene de patogenicidade *hrpB* e do *cluster* referente à síntese do pigmento xantomonadina. Ambos os pares foram testados em PCR convencional (cPCR) e PCR em tempo real (qPCR). Os *primers* para o gene *hrpB* apresentaram especificidade limitada, mas foram eficientes para uso tanto em cPCR quanto em qPCR, enquanto os *primers* para o *cluster* da xantomonadina foram altamente específicos para Xcv, mas mostraram baixa eficiência no formato qPCR. O uso do enriquecimento dos extratos de plantas em meio de cultura semisseletivo antes da PCR possibilitou um expressivo aumento em sensibilidade quando comparado ao protocolo de extração do DNA total da amostra, sendo possível detectar até  $10^1$  UFC ml<sup>-1</sup>. Em condições de infecção natural no campo, amostras de videiras sintomáticas e assintomáticas foram testadas por dois protocolos: qPCR com *primers* para *hrpB* e cPCR com *primers* para xantomonadina. Nos dois casos empregou-se o enriquecimento prévio dos extratos em meio de cultura por 36-72h. Detectou-se a presença de Xcv em todas as amostras sintomáticas, sendo que esse resultado foi confirmado por cPCR com os *primers* específicos Xpig2F/1R. Nas amostras assintomáticas, a bactéria foi detectada em 93,4% por qPCR e em 89,5% por cPCR. Esses dois protocolos apresentam vantagens quanto à especificidade e sensibilidade, e poderão ser incluídos em programas de quarentena e certificação de mudas e/ou material de propagação de videira, detecção de fontes de inóculo em hospedeiras alternativas, contribuindo para evitar a disseminação do patógeno para áreas livres do cancro bacteriano.

**Palavras-chave:** cancro bacteriano, *Vitis vinifera*, *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, PCR convencional, diagnose, qPCR

## **Detection of *Xanthomonas citri* pv. *viticola* on grapevine by real-time PCR and BIO-PCR using primers designed from pathogenicity and xanthomonadin gene sequences**

### **ABSTRACT**

*Xanthomonas citri* pv. *viticola* [= *X. campestris* pv. *viticola* (Xcv)], causal agent of grapevine bacterial canker, was detected in Brazil in 1998 and is currently regarded as a quarantine pathogen with limited distribution in the country. To improve specificity, sensitivity and speed in the detection of Xcv in asymptomatic grapevines, two pairs of primers were selected, targeting sequences of a pathogenicity gene (*hrpB*) and the xanthomonadin coding cluster. Both pairs were tested in conventional PCR (cPCR) and real-time PCR (qPCR) formats. Primers targeting the *hrpB* gene showed cross reactions with other xanthomonads but were efficient for use in both cPCR and qPCR, whereas primers for the xanthomonadin gene were highly specific for Xcv but showed low efficiency in the qPCR format. Enrichment of plant extracts in semi-selective culture medium before PCR allowed a significant increase in sensitivity when compared to total DNA extraction protocol, making it possible to detect as low as 10 CFU ml<sup>-1</sup>. Under natural infection conditions, samples of symptomatic and asymptomatic grapevines were tested by two protocols: qPCR with primers *hrpB* and cPCR with xanthomonadin primers. In both cases, the plant extracts were enriched in culture medium for 36-72h. Xcv was detected in all symptomatic samples, and the result was confirmed by cPCR with the more specific primers Xpig2F/1R. For the asymptomatic samples, Xcv was detected in 93.4% with qPCR and in 89.5% of the samples with cPCR. These two protocols offer advantages in terms of sensitivity and specificity, and they could be useful in quarantine programs, certification of grapevine propagating material and detection of inoculum sources in alternative hosts, contributing to the prevention of pathogen spread to disease-free areas.

**Keywords:** grapevine bacterial canker, *Vitis vinifera*, *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*.  
PCR-based diagnosis, qPCR

## 1. INTRODUÇÃO

Até 1998, a ocorrência de doenças bacterianas na videira no Brasil limitava-se à galha da coroa (*Rhizobium radiobacter*; *R. vitis*) de forma esporádica no Nordeste, em Minas Gerais e São Paulo ((Malavolta Júnior et al., 1999; Lima et al., 1999), e sem causar grandes prejuízos. No início de 1998, detectou-se pela primeira vez o cancro bacteriano em parreirais da variedade Red Globe no Submédio do Vale do São Francisco, em Petrolina, PE (Malavolta Júnior. *et al.*, 1999; Lima *et al.*, 1999). Seu agente causal foi identificado como *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye (Xcv). Contudo, estudos posteriores, com base em sequências de genes *housekeeping* e análises genômicas (Parkinson et al., 2009; Midha & Patil, 2014; Bansal et al., 2017; Ferreira et al., 2019) sugeriram a necessidade de reclassificação do patovar na espécie *X. citri* e, recentemente, uma nova nomenclatura para este patógeno foi proposta (Gama et al., 2018). Atualmente é um patógeno regulamentado e classificado como Praga Quarentenária Presente (PQP), com registro nos estados de Pernambuco, Bahia, Ceará e Roraima, e sujeito a programa oficial de controle segundo a Instrução Normativa Nº 2, de 6 de fevereiro de 2014, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2014).

O diagnóstico precoce de doenças em plantas é uma etapa crucial no sistema de controle e proteção da agricultura. A diagnose do cancro bacteriano da videira pode ser feita com base na avaliação dos sintomas, isolamento do patógeno em meio de cultura, realização de testes bioquímicos e de patogenicidade, e teste de hipersensibilidade em folhas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Santa Clara). No entanto, esses métodos apresentam limitações em função do tempo gasto e da dificuldade de se fazer a diagnose precoce em material assintomático (Trindade et al., 2007). Outros métodos desenvolvidos que auxiliam na diagnose da doença são: ELISA com anticorpos policlonais (Araújo et al., 2005), uso de meio semisseletivo para isolamento de Xcv (Peixoto et al., 2006), e PCR com *primers* semi-específicos (Trindade et al., 2007).

Nas últimas décadas, métodos rápidos, específicos e sensíveis, têm sido disponibilizados para a detecção de fitopatógenos em material vegetal (Vincelli & Tisserat, 2008). A PCR e suas variações, como BIO-PCR e PCR em tempo real (qPCR), tornaram-se os métodos padrões para a detecção e a identificação de bactérias fitopatogênicas (Palacio-Bielsa et al., 2009; Bull & Koike, 2015).

BIO-PCR, descrita por Schaad et al. (1995), consiste na amplificação biológica do alvo, seguida da amplificação do DNA por PCR, o que permite reduzir o limiar de detecção relativamente à PCR convencional. Além disso, sua especificidade, dispensa as etapas de isolamento e testes adicionais para identificação do organismo alvo. Outras vantagens associadas à BIO-PCR são: a eliminação de inibidores de PCR e a detecção unicamente de células viáveis. Por isso, tornou-se um método útil na detecção de patógenos transmitidos por sementes (Singh et al., 2014).

A qPCR é uma evolução do método de PCR, pois combina a amplificação exponencial de um fragmento de DNA alvo específico com métodos de quantificação, por meio da medição da fluorescência associada à síntese dos *amplicons*, ao longo dos ciclos da PCR. Essa combinação faz com que a qPCR seja um método sensível, robusto e com boa reprodutibilidade para medidas quantitativas (Schaad & Frederick, 2002). A qPCR apresenta diversas vantagens sobre a PCR convencional (cPCR), entre elas destaca-se a maior rapidez por dispensar a eletroforese em gel de agarose para detecção dos *amplicons*, uma vez que a leitura e a quantificação de produtos são obtidas a cada ciclo. Isso é possível graças ao uso de um dos sistemas de detecção: que empregam fluoróforos intercalantes, como SYBR® Green ou similar, ou que utiliza sondas de hidrólise, método conhecido como TaqMan®. Devido às vantagens desse método, a qPCR vem sendo amplamente usada para detecção de bactérias fitopatogênicas (Dreo et al., 2007; Bertolini et al., 2014; Wu et al., 2017, Loreti et al., 2018), incluindo as do

gênero *Xanthomonas* (Mavrodieva et al., 2004; Vandroemme et al., 2008; Palacio-Bielsa et al., 2011; Robène et al. 2015).

Para a detecção e identificação de Xcv, Trindade et al. (2007) desenvolveram um protocolo baseado no método de PCR convencional utilizando os pares de *primers* Xcv1F/3R e RST2/Xcv3R, os quais amplificam uma sequência parcial do gene *hrpB* (*hrcN*), que codifica uma das proteínas componentes do sistema de secreção tipo III (TTSS), responsável pela translocação de proteínas efetoras para o interior da célula hospedeira, sendo um determinante de patogenicidade em espécies de *Xanthomonas* (Kay & Bonas, 2009). A aplicação desses *primers* para a detecção e identificação de Xcv foi testada em diferentes formatos e tipos de amostra: (i) DNA genômico purificado da bactéria, (ii) suspensão bacteriana, (iii) extratos de tecidos de videira previamente inoculados e (iv) lavados de folhas e frutos enriquecidos ou não em meio de cultura líquido ou sólido (Freitas, 2012; Trindade, 2007; Trindade et al., 2007). A detecção de Xcv não foi possível quando extratos de tecidos inoculados foram usados diretamente nas reações de PCR, mas amplificações foram positivas quando se utilizou uma etapa de enriquecimento em meio de cultura antes da PCR (BIO-PCR). Além disso, a BIO-PCR com os *primers* Xcv1F/3R, apresentou melhores resultados na detecção de Xcv em plantas assintomáticas, quando comparada à Nested-PCR, sem enriquecimento em meio de cultura. (Freitas, 2012). Embora os protocolos desenvolvidos mostrassem potencial para a detecção de Xcv em material assintomático, os *primers* usados mostraram-se semi-específicos e o número de etapas necessárias para a execução da BIO-PCR e procedimentos pós amplificação tornam o processo pouco prático.

O controle eficiente de doenças de plantas de etiologia bacteriana exige uma combinação de métodos, incluindo o uso de material sadio e práticas adequadas de cultivo (Janse & Wenneker, 2002). No Brasil a cultura da videira encontra-se em expansão para outras regiões sem tradição da viticultura, como estados da região centro-oeste (DF, GO e MT). Assim, o uso

de material propagativo certificado é imprescindível para evitar a introdução e disseminação de Xcv em novas áreas. Diante da necessidade da detecção precoce de Xcv em material vegetal assintomático, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver novos protocolos para detecção específica, sensível e rápida via cPCR e qPCR, melhorando os já existentes.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Isolados bacterianos e material vegetal**

Os isolados bacterianos utilizados no estudo estão listados na Tabela 1. Isolados de Xcv foram previamente identificados por PCR utilizando os *primers* semi-específicos Xcv1F/3R (Trindade *et al.*, 2007). Todos os isolados foram preservados em água destilada esterilizada à temperatura ambiente e em glicerol 30% a -20 °C, e cultivados nos meios 523 (Kado & Heskett, 1970) ou NYDAM (Peixoto *et al.*, 2006) a 28°C por 2-3 dias. Em todos os ensaios de PCR, o isolado de Xcv UnB 1188, proveniente da Coleção de Bactérias Fitopatogênicas do Departamento de Fitopatologia da UnB, foi utilizado como controle positivo. Nos ensaios de detecção de Xcv em material vegetal foram utilizadas folhas de plantas sadias de videira (*Vitis vinifera*) da variedade Thompson Seedless, mantidas em casa de vegetação. Todos os materiais usados para manipulação de Xcv e inoculação foram esterilizados antes do descarte.

### **2.2. Moldes para PCR e extração de DNA**

Os moldes para as reações de PCR foram: (i) DNA genômico bacteriano, (ii) suspensão bacteriana, (iii) DNA de folhas de videiras sadias, e (iv) DNA total de extrato de folhas de videiras sadias misturado com suspensão bacteriana. A concentração da suspensão bacteriana de Xcv foi determinada por espectrofotometria [ $A_{550} = 0,575$ , UV-1203 (Shimadzu Corporation, Japão)] que corresponde a  $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup> e confirmada pela contagem em placas contendo meio NYDAM.

DNA genômico dos isolados foi extraído a partir de culturas puras de 48 h em meio 523, utilizando o kit de extração PureLink (Invitrogen), conforme recomendações do fabricante. Para extração do DNA de folhas de videira foi utilizado o método CTAB (Doyle & Doyle, 1990). A purificação de DNA a partir de extratos de folhas de videira misturados à suspensão bacteriana foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Llop et al. (1999). A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% e a quantidade e pureza determinada pelo espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare – Life Sciences). Em seguida foram preparadas alíquotas de trabalho na concentração de 10 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  e estas foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3. Desenho de *primers*

Novos *primers* foram desenhados com base na sequência parcial do gene *hrpB* (*primers* Xcv) (Trindade *et al.*, 2007) e do *cluster* de genes envolvidos na síntese da xantomonadina (*primers* Xpig) do isolado tipo de Xcv (LMG 965) (Midha & Patil, 2014) (Tabela 2). A ausência de xantomonadina em Xcv, diferente da maioria das *Xanthomonas*, pode ser usada como um marcador fenotípico. Neste sentido, sequências do *cluster* de genes envolvidos na síntese da xantomonadina de Xcv (CBZT010000000) e de *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* (KF991092), foram alinhadas utilizando o *plugin* MAFFT (Kato et al., 2002) no software Geneious R8 (Kearse et al., 2012). A região selecionada para o desenho dos *primers* Xpig encontra-se entre uma zona intergênica e o gene 3-oxoacyl-[ACP] redutase, ausente em *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* devido a presença de um transposon (IS). Além disso, o *primer* reverso (Xpig 1R) foi selecionado dentro de uma região polimórfica na qual *X. citri* pv. *citri* difere de Xcv, conforme descrito por Midha & Patil (2014) (Figura 1).

Os *primers* foram desenhados utilizando *plugin* Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000) e sintetizados pela Invitrogen (Life Technologies). A especificidade dos novos *primers* e as



sequências dos *amplicons* foram comparadas *in silico* com sequências disponíveis no GenBank pelo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

#### **2.4. PCR convencional (cPCR)**

Os pares de *primers* desenhados para detecção de Xcv, foram inicialmente testados em cPCR utilizando como molde suspensões bacterianas ( $10^7$  UFC ml<sup>-1</sup>) de sete isolados de Xcv. Foram realizados dois ensaios independentes com três replicatas por amostra. Para a escolha dos melhores pares, foram estabelecidos os seguintes critérios: amplificação do produto de tamanho esperado, ausência de bandas inespecíficas, reprodutibilidade e amplificação positiva para todos os isolados de Xcv testados.

As reações foram realizadas em termociclador (My Cycler, Bio-Rad) de acordo com o programa: 2 min a 95 °C, seguido por 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 64 °C (*primers* Xcv) ou 68 °C (*primers* Xpig), e 15 s a 72 °C e um período de extensão final de 10 min a 72 °C. As reações continham: 0,1 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 μM (*primers* Xcv) ou 0,2 μM (*primers* Xpig) de cada *primer*, 1X tampão de PCR (20 mM de Tris HCl pH 8,4; 50 mM KCl), 1 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), 2 μl de molde (DNA genômico ou suspensão bacteriana) e água destilada esterilizada para um volume final de 12 μl. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5 % em tampão 0,5X TBE [Tris 50 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM, ácido bórico 50 mM (pH 8,3)], corados com brometo de etídio (0,5 μg ml<sup>-1</sup>) e registrados em fotodocumentador L-PIX ST (Loccus Biotecnologia). Em todos os ensaios de detecção por cPCR foram incluídos como controles positivo e negativo, DNA genômico de Xcv e água destilada esterilizada, respectivamente.

## 2.5. PCR em tempo real (qPCR)

Os pares selecionados em cPCR foram testados em qPCR com o objetivo de selecionar a combinação mais adequada ao método. Os critérios para escolha da melhor combinação foram: eficiência de amplificação entre  $100 \pm 10\%$ , ausência de dímeros de *primers* ou produtos inespecíficos, e reprodutibilidade.

As reações foram realizadas em um termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando o sistema SYBR® Green para detecção da fluorescência. As reações de amplificação foram preparadas para um volume final de 15 µl, contendo 1 µl de molde (DNA genômico ou suspensão bacteriana), 1X do Master Mix SYBR Green (Applied Biosystems) e 0,05 µM (*primers Xcv*) ou 0,04 µM (*primers Xpig*) de cada primer. As condições de ciclagem foram: 10 min a 95°C, seguido por 40 ciclos de dois passos de 15 s a 95°C, 1 min a 64°C (*primers Xcv*) ou 67 °C (*primers Xpig*) e extensão final de 1 min a 60°C.

A eficiência de amplificação foi determinada por meio da construção de curvas padrão, em que foram utilizadas diluições em série (1:10) de DNA genômico (1,5 ng µl<sup>-1</sup> a 150 fg µl<sup>-1</sup>) e suspensão bacteriana (10<sup>8</sup> UFC ml<sup>-1</sup> a 1 UFC ml<sup>-1</sup>) de Xcv. As curvas padrão foram obtidas por regressão do número de ciclos *threshold* (Ct) *versus* logaritmo da quantidade inicial de Xcv. A inclinação (*slope*) de cada curva padrão gerada foi utilizada para calcular a eficiência da qPCR (E), de acordo com a equação  $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$ , onde E = 1 corresponde a uma eficiência de amplificação de 100%. Foram realizados dois ensaios independentes com oito replicatas para cada diluição. Para verificar a ausência de dímeros de *primers* ou produtos inespecíficos, todas as reações foram finalizadas com a curva de *melting*. Em todos os ensaios de detecção por qPCR foram incluídos como controles positivo e negativo, DNA genômico de Xcv e água destilada esterilizada, respectivamente.

## **2.6. Especificidade e sensibilidade: cPCR e qPCR**

Todos os pares de *primers* previamente selecionados em cPCR foram testados quanto à especificidade para Xcv. Para realização dos testes de especificidade foram utilizados 40 isolados de Xcv, 11 isolados pertencentes a diferentes espécies ou patovares de *Xanthomonas*, 12 isolados de diferentes espécies de bactérias fitopatogênicas e 41 isolados de bactérias epifíticas e/ou endofíticas associadas a nove variedades de videira (Tabelas 1 e 3). O isolamento das bactérias associadas a videira foi realizado pelo esmagamento de folhas e pecíolos, seguido de plaqueamento em meio 523. Culturas puras, desses isolados foram estabelecidas e caracterizadas fenotipicamente (Tabela 3), conforme protocolos descritos por Schaad et al., (2001). O DNA purificado de folhas de videira também foi testado, com objetivo de descartar falso-positivos em material sadio. A sensibilidade de detecção de Xcv foi determinada por cPCR e qPCR utilizando DNA genômico e suspensão bacteriana. Diluições em série (1:10) foram realizadas obtendo gradientes de concentração variando entre 1,5 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  e 150 fg  $\mu\text{l}^{-1}$  para DNA genômico e  $10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  e 1 UFC  $\text{ml}^{-1}$  para suspensão bacteriana. Foram realizados dois ensaios independentes e para cada diluição foram realizadas oito reações.

## **2.7. Limiar de detecção de Xcv em material vegetal por extração de DNA total e PCR**

Para determinar o limiar de detecção de Xcv em material vegetal por extração de DNA total e PCR, foram preparados extratos de folhas de videira misturados à suspensão bacteriana em diferentes concentrações. Para preparo do extrato, 1g (peso fresco) de tecido foliar sadio foi esmagado em cadinho contendo 15 ml de água destilada esterilizada. Cem microlitros de suspensões nas concentrações de  $10^8$  a  $10^1$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  foram adicionados a alíquotas de 900  $\mu\text{l}$  de extrato de foliar. Assim, cada amostra continha quantidades decrescentes de células, variando de  $10^7$  a 1 UFC  $\text{ml}^{-1}$ . Como controle positivo do ensaio, suspensões bacterianas puras variando de  $10^7$  a  $10^1$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  também foram testadas. O controle negativo consistiu de extrato

de folhas sem adição de Xcv. Os DNAs obtidos de cada amostra foram analisados por cPCR e qPCR, conforme os protocolos descritos anteriormente. Foram realizados dois ensaios independentes, com quatro repetições independentes para cada concentração de inóculo e duas reações amplificação por repetição, totalizando oito reações por tratamento (concentração de inóculo).

## **2.8. Limiar de detecção de Xcv em material vegetal após enriquecimento (BIO-PCR)**

Para determinar o limiar de detecção de Xcv em material vegetal por BIO-PCR, também foram utilizados extratos de folhas de videira misturado com suspensão bacteriana em diferentes concentrações. O modo de preparo e as concentrações de inóculo testadas foram os mesmos descritos no item anterior. Cem microlitros de cada amostra foram depositados e espalhados, com auxílio de uma alça de Drigalski flambada, sobre o meio semisseletivo NYDAM (Peixoto et al., 2006). Para cada amostra foi utilizada uma placa. As placas foram incubadas a 28°C por 72 horas. Como controle positivo do ensaio, 100 µl das suspensões bacterianas puras ( $10^8$  a  $10^1$  UFC ml<sup>-1</sup>), as quais foram utilizadas para enriquecimento, também foram plaqueadas. O controle negativo consistiu de extrato de folhas sadias sem adição de Xcv. Após o período de incubação, cada placa foi lavada com 1 ml de água destilada esterilizada, obtendo-se uma suspensão concentrada, a qual foi armazenada em microtubos Eppendorf. Em seguida cada suspensão foi diluída na proporção 1:100. Dessas diluições foram retiradas alíquotas para análise em cPCR e qPCR, conforme os protocolos descritos anteriormente. Foram realizados dois ensaios independentes, com três repetições independentes para cada concentração de inóculo e três reações de amplificação para cada repetição, totalizando nove reações por tratamento (concentração de inóculo).

## **2.9. Validação dos protocolos de PCR para a detecção de Xcv em área de ocorrência do cancro bacteriano**

Amostras sintomáticas e assintomáticas de folhas, ramos, pecíolos e raízes de videira, além de folhas da hospedeira alternativa, *Amaranthus* sp., foram coletadas em um parreiral localizado na Estação Experimental de Bebedouro da Embrapa Semiárido no perímetro irrigado de Petrolina, PE, em maio de 2018. Foram coletadas 75 amostras de folhas (incluindo pecíolo), 25 com sintomas e 50 amostras sem sintomas, provenientes de 17 variedades de videira e de *Amaranthus* sp., além de 12 amostras de raízes coletadas de plantas da variedade Red Globe com sintomas severos de cancro bacteriano (Tabelas 8 e 9). Outras 25 amostras foram coletadas de mudas de videira produzidas em viveiros em Petrolina, PE e mantidas em casa de vegetação na Embrapa Semiárido. As mudas pertenciam à diferentes acessos de híbridos e às variedades IAC 313 (porta enxerto) e Red Globe. Do total de 25 amostras de folhas (incluindo pecíolo), 11 apresentavam sintomas e em 14 não havia sintomas visíveis (Tabelas 8 e 9).

Após a coleta, todas as amostras foram levadas para laboratório para processamento e triagem. As amostras foram lavadas em água corrente e secas em papel toalha e, em seguida 1 g de cada amostra foi esmagada em cadinho contendo 15 ml de água destilada esterilizada. Do extrato obtido, 100 µl foram plaqueados em meio NYDAM. Para cada amostra foi utilizada uma placa. As placas foram incubadas a 28°C por 36 horas (amostras com sintomas) ou 72 horas (amostras sem sintomas). Após a incubação, cada placa foi lavada com 1 ml de água destilada estéril e as suspensões concentradas obtidas diluídas na proporção 1:100. Dessas diluições, foram retiradas alíquotas para análise em cPCR e qPCR. Cada amostra foi analisada em triplicata conforme os protocolos descritos anteriormente. As 36 amostras com sintomas foram processadas para isolamento de Xcv em meio NYDAM. Colônias típicas da bactéria foram selecionadas, culturas puras foram estabelecidas e submetidas à cPCR, para confirmação da identidade da bactéria.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Desenho e seleção de *primers*

Por meio de análises realizadas *in silico* pelo BLAST com as sequências dos novos *primers*, desenhados a partir do gene de patogenicidade *hrpB* e do *cluster* da xantomonadina e seus respectivos *amplicons*, não foi encontrada nenhuma homologia com sequências de outras espécies disponíveis no GenBank.

Atendendo aos critérios preestabelecidos para o uso em cPCR, foram selecionados seis pares de *primers* para o gene *hrpB* (*primers* Xcv) entre os 10 pares inicialmente testados e dois pares desenhados para o *cluster* da xantomonadina (*primers* Xpig). As combinações selecionadas encontram-se na Tabela 2.

Os oito pares de *primers* selecionados em cPCR foram, em seguida, testados em qPCR. O objetivo foi selecionar as combinações mais adequadas ao método. Dentre as combinações selecionadas, o par Xcv18F/19R atendeu a todos os critérios previamente estabelecidos. As reações apresentaram eficiência de amplificação dentro dos valores aceitáveis ( $100 \pm 10\%$ ) (Tabela 4) e por meio da análise das curvas de *melting*, foi observada a formação de um pico único referente à temperatura de *melting* ( $T_m$ ), sem sinais interferentes, indicando a amplificação apenas do *amplicon* desejado (Figura 3). Os parâmetros de desempenho da qPCR, e as respectivas curvas de amplificação e padrão encontram-se na Tabela 4 e nas Figuras 4 e 5, respectivamente.

#### 3.2. Especificidade e sensibilidade: cPCR e qPCR

Testes de especificidade realizados em cPCR, mostraram que os oito pares de *primers* selecionados (Tabela 2) foram eficientes na identificação dos 40 isolados de Xcv, não havendo amplificação para os 41 isolados de bactérias epifíticas e/ou endofíticas associadas a folhas videira e com o DNA de folhas de videira. Os *primers* para amplificação parcial do *cluster* de

genes envolvidos na síntese da xantomonadina (*primers* Xpig) foram altamente específicos para Xcv, pois a amplificação foi negativa para todos os outros isolados de bactérias fitopatogênicas testados. No entanto, reações utilizando os *primers* para o gene *hrpB* (*primers* Xcv) apresentam amplificações positivas para alguns isolados do gênero *Xanthomonas* (Tabela 5). Em relação ao DNA de folhas de videira nenhum *amplicon* foi obtido em reações onde foram utilizados os *primers* selecionados (Figura 2).

Os seis isolados de diferentes espécies de *Xanthomonas* (*X. axonopodis* pv. *passiflorae*, *X. citri* pv. *citri*, *X. citri* pv. *fuscans*, *X. citri* pv. *mangiferaeindicae*, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e *X. axonopodis* pv. *ricini*) para os quais houve amplificação positiva utilizando os *primers* Xcv18F/19R, também foram testados em qPCR, com objetivo de verificar se o número de ciclos *threshold* (Ct) e a temperatura de *melting* (Tm) eram distintos em relação à Xcv. Observou-se que os *amplicons* obtidos a partir do DNA dessas espécies possuíam tanto o Ct quanto o Tm próximos. As exceções foram para os isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (Ct = 35,09) e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Ct = 36,06), os quais apresentaram valores de Ct superiores à Xcv (Ct = 18,40), a partir de uma mesma concentração inicial de DNA genômico (5 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ ) (Figura 3).

A sensibilidade de detecção de Xcv por PCR foi avaliada utilizando os pares de *primers* Xcv18R/19R e Xpig2F/1R. O par Xcv18F/19R foi escolhido por ser adequado para uso em ambos formatos de PCR (cPCR e qPCR) e o par Xpig2F/1R devido à sua alta especificidade para Xcv. A sensibilidade de detecção por cPCR foi de 15 pg  $\mu\text{l}^{-1}$  para DNA genômico e de  $10^3$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  para suspensão bacteriana, não havendo diferença entre os *primers* utilizados. No entanto a sensibilidade em qPCR foi superior à obtida em cPCR, sendo de 1,5 pg  $\mu\text{l}^{-1}$  (Ct = 35,56) para DNA genômico e  $10^2$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  para suspensão bacteriana (Ct = 36,59) (Tabela 6).

### 3.3. Limiar de detecção de *Xcv* em material vegetal

O limiar de detecção de *Xcv* em extratos de folhas misturados às suspensões bacterianas foi avaliado por extração de DNA total e enriquecimento prévio em meio NYDAM (BIO-PCR), ambos seguidos por cPCR e qPCR. Em cPCR foram utilizados os pares de *primers* *Xcv*18F/19F e *Xpig*2F/1R, e em qPCR apenas o par *Xcv*18F/19R.

O limiar de detecção por meio de extração de DNA total foi de  $10^3$  UFC ml<sup>-1</sup> em cPCR, não havendo diferença entre os *primers* utilizados. Em qPCR a sensibilidade foi dez vezes superior, ou seja, de  $10^2$  UFC ml<sup>-1</sup> (Ct = 35,83) (Tabela 7).

Por BIO-PCR o limiar de detecção em cPCR foi de uma concentração inicial de  $10^2$  UFC ml<sup>-1</sup>, não havendo diferença entre os *primers* utilizados. Já em qPCR a sensibilidade foi dez vezes superior, detectando-se uma concentração inicial de apenas  $10^1$  UFC ml<sup>-1</sup> (Ct = 34,42) (Tabela 7). Assim, a combinação de enriquecimento prévio das amostras em meio de cultura semisseletivo e qPCR, foi o protocolo que possibilitou a maior sensibilidade de detecção de *Xcv*.

### 3.4. Validação dos protocolos de PCR para a detecção *Xcv* em área de ocorrência do cancro bacteriano

Por sua maior sensibilidade, o protocolo que empregou o enriquecimento em meio de cultura (BIO-PCR), foi escolhido para sua validação em área com ocorrência natural da doença. Um total de 112 amostras foi coletado e analisado por cPCR com os *primers* específicos *Xpig*2F/1R e qPCR com os *primers* semi-específicos *Xcv*18F/19R. O valor de Ct de 34,42 foi estabelecido como o valor máximo para uma amostra ser considerada positiva por qPCR, uma vez que este valor representa o limiar de detecção do método que corresponde à  $10^1$  UFC ml<sup>-1</sup>.

Das 75 amostras de folhas coletadas em campo (25 com sintomas e 50 sem sintomas visíveis), a bactéria foi detectada em todas as amostras, não havendo diferença entre os métodos



de detecção utilizados (Tabelas 8 e 9). Enquanto isso, para as 12 amostras de raízes sem sintomas visíveis, a bactéria foi detectada em nove por qPCR (75,0%) e em seis amostras por cPCR (50,0%). Do total de 25 amostras coletadas em casa de vegetação, a bactéria foi detectada em todas 11 amostras sintomáticas e em 12 assintomáticas. Xcv não foi detectada na amostra do porta-enxerto IAC 313 e em um dos acessos de híbridos (Tabelas 8 e 9).

Das 36 amostras com sintomas, culturas puras típicas de Xcv foram obtidas a partir de 29. Todos os isolados obtidos tiveram sua identidade confirmada por cPCR com os *primers* Xpig2F/1R. Devido à presença de outras bactérias e outros agentes saprófitas, o isolamento de Xcv de sete amostras não foi possível. No entanto, em todas as 36 amostras sintomáticas, a presença de Xcv foi confirmada tanto por cPCR quanto por qPCR.

#### **4. Discussão**

O desenvolvimento de protocolos eficientes de detecção de patógenos em material vegetal assintomático é uma demanda no processo quarentenário, nos estudos epidemiológicos e para o controle de doenças. Protocolos de detecção específicos, sensíveis e rápidos são de extrema importância em programas de certificação de materiais de propagação vegetativa, pois, populações latentes podem causar epidemias severas em condições ambientais favoráveis. A introdução de Xcv no Brasil deu-se possivelmente pelo trânsito irregular de material de propagação de videira contaminado, proveniente da Índia. Essa bactéria é responsável por causar danos severos em pomares no Submédio do Vale do São Francisco, principalmente em uvas de mesa, além de representar alto risco ao desenvolvimento da viticultura nacional. No estado de São Paulo, por exemplo, a detecção de Xcv em 2009 levou à erradicação de aproximadamente 4.700 plantas (Rodrigues Neto et al., 2011). Claramente, a exclusão de material infectado por Xcv é muito importante para prevenir a introdução do cancro bacteriano

em áreas livres da doença. Para este propósito, é necessário o desenvolvimento de protocolos de detecção eficazes que combinem alta especificidade, sensibilidade e rapidez.

*Primers* (Xcv1F/3R) para detecção de Xcv em plantas sintomáticas e assintomáticas já foram desenvolvidos, porém apresentaram limitações quanto à especificidade e adequação à qPCR (Trindade et al., 2007). Testes preliminares (dados não apresentados) em qPCR com o sistema de detecção SYBR<sup>®</sup> Green, mostraram que o par Xcv1F/3R não foi adequado, pois apresentou baixa sensibilidade de detecção e eficiência de reação, além da formação de dímeros de *primers*. Assim, novos *primers* para uso em qPCR foram desenhados, visando à amplificação de novos sítios na mesma sequência do gene de patogenicidade *hrpB*.

Em bactérias fitopatogênicas o sistema de secreção tipo III é codificado pelo *cluster* de genes *hrp*, sendo este altamente conservado em *Xanthomonas* (Leite Júnior et al., 1994a), mas úteis para diferenciar espécies e patovares deste gênero (Leite Júnior et al., 1994b; Roberts et al., 1996). Testes de especificidade com os novos *primers* desenhados para o gene *hrpB* mostraram que, além de Xcv, DNA não-alvo de outras espécies e patovares de *Xanthomonas* também foram amplificados. Trindade et al. (2007) também observaram que reações com o par Xcv1F/3R, amplificaram o DNA de quatro isolados de *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* e cinco isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*.

Os *primers* Xcv18F/19R utilizados nos ensaios de detecção em material vegetal, apresentaram o mesmo nível de especificidade do par Xcv1F/3R, mas com sensibilidade superior e adequado para uso em qPCR. Além disso, nenhuma amplificação foi detectada em 41 isolados bacterianos da microbiota natural da videira provenientes de diferentes ambientes e variedades de uva (Tabelas 1, 3 e 5). Uma vez que não há relatos da ocorrência natural desses patovares em *V. vinifera* e considerando que, em geral, as espécies de *Xanthomonas* possuem uma faixa restrita de hospedeiros, é muito improvável que esses resultados limitem o uso desses *primers* para detecção de Xcv em videiras e diagnóstico cancro bacteriano da videira.

Procurando por um alvo mais específico, usamos uma abordagem genômica para selecionar sítios de anelamento adicionais. *Xcv* é uma *Xanthomonas* não pigmentada e todos os isolados coletados no Brasil produzem colônias creme-esbranquiçadas. Assim, *primers* visando essa característica do patovar, minimizariam o risco de falsos positivos nos procedimentos diagnósticos.

A síntese do pigmento xantomonadina depende da expressão de um *cluster* de genes. O sequenciamento completo do genoma do patotipo LMG 965 (Midha & Patil, 2014) mostrou algumas características especiais nesse *cluster*, responsáveis pela falta de pigmentação em *Xcv*. Os autores mostraram a ocorrência de uma deleção de quatro nucleotídeos no gene que codifica a enzima fosfotransferase/desidratase em *Xcv* e um elemento de inserção (IS) no *pv. mangiferaeindicae*, que também possui isolados sem pigmentação. Os *primers* Xpig foram desenhados com base nesses polimorfismos, e por meio dos ensaios realizados, foi confirmado a sua especificidade para *Xcv* tanto *in silico* quanto *in planta*.

Ensaio preliminares de detecção de *Xcv* foram realizados utilizando extrato de folhas de videira misturados à suspensão bacteriana diretamente na PCR, no entanto não houve sucesso, possivelmente devido à presença de compostos inibidores, tais como polifenóis. Estes compostos afetam diretamente a PCR, exercendo um efeito direto sobre a polimerase ou ligando-se ao DNA (Palacio-Bielsa et al., 2009). Trindade et al. (2007) também observaram que não foi possível detectar *Xcv* diretamente em extratos de tecidos previamente inoculados. Para contornar esse problema, antes da PCR as amostras passaram por uma etapa de extração de DNA total ou de enriquecimento em meio de cultura semisseletivo (BIO-PCR).

A extração de DNA total de extratos de videira misturados à suspensão bacteriana de *Xcv*, em diferentes concentrações, não melhorou a sensibilidade quando comparado à suspensão pura. Os limiares de detecção foram os mesmos  $10^3$  (cPCR) e  $10^2$  UFC ml<sup>-1</sup> (qPCR). Para outras espécies de *Xanthomonas*, patogênicas à mandioca, foi demonstrado que a etapa de

purificação do DNA auxiliou no diagnóstico, concentrando o DNA e eliminando os inibidores da PCR, diminuindo assim o limiar de detecção (Flores et al., 2019). No presente estudo, a maior sensibilidade foi obtida combinando-se o enriquecimento da população bacteriana e a qPCR. O passo de extração de DNA total, embora menos demorado, pode ser mais adequado para detectar *Xcv* em material sintomático por cPCR, pois neste caso, alta sensibilidade não seria requerida, devido à grande população bacteriana dentro dos tecidos da planta. No entanto, a escolha do método a ser utilizados dependerá dos recursos do laboratório, do número de amostras a serem testadas e da clara evidência dos sintomas. Uma PCR duplex com ambos os conjuntos de *primers* também é viável, uma vez que ambos os *primers* têm a mesma sensibilidade em cPCR. Os dois *amplicons* diferem em 48 pb, portanto, seria necessário um gel de agarose mais concentrado, entre 1,5 e 2,0 %, para possibilitar a separação e visualização de ambos os fragmentos.

Utilizando a etapa prévia de enriquecimento das amostras em meio de cultura semisseletivo foi observado aumento da sensibilidade em dez vezes, quando comparado com a extração de DNA total. A maior sensibilidade foi obtida no formato qPCR, detectando uma concentração inicial de  $10^1$  UFC ml<sup>-1</sup>, sensibilidade adequada para detecção em material assintomático. Esse resultado é comparável a outros protocolos de qPCR, como o empregado para a detecção de *X. arboricola* pv. *pruni* em ameixa (Ballard et al., 2011). Freitas (2012), utilizando lavado de folhas seguido de plaqueamento em meio semisseletivo, relata não ter sido possível detectar *Xcv* em 100% das repetições em concentrações inferiores a  $10^5$  UFC ml<sup>-1</sup> (Freitas, 2012). Entretanto, com o protocolo aqui proposto, *Xcv* foi detectada em todas as repetições, mesmo em concentrações mais baixas.

O protocolo foi validado com amostras de campo em ambos os formatos de PCR, uma vez que a técnica de qPCR pode não estar acessível a muitos laboratórios no Brasil. Os resultados mostraram que o protocolo recém desenvolvido pode ser usado para a detecção de

Xcv em amostras de videira sintomáticas e assintomáticas e em hospedeiros alternativos. A presença de Xcv foi detectada por qPCR em 100% das amostras sintomáticas e em 93,4% das assintomáticas. Para amostras de folhas, não houve diferença entre as técnicas utilizadas para detecção, isto é, as amostras positivas por qPCR também foram positivas por cPCR. No entanto, para algumas amostras com Ct acima de 27,0, as bandas de DNA nos géis de agarose foram pouco intensas. Em amostras de raízes, a qPCR foi mais eficiente. Xcv coloniza plantas de videira sistemicamente, tendo sido detectada em diferentes pontos, partes aéreas, porta-enxertos, bagas e sementes de uva (Tostes et al., 2014). No presente trabalho relatamos a sua presença em raízes de videiras da variedade Red Globe com sintomas severos de cancro bacteriano.

Os protocolos desenvolvidos neste estudo mostraram-se úteis para a detecção de Xcv em amostras assintomáticas, sendo ferramentas valiosas para a detecção e identificação de Xcv em diferentes situações, tanto para fins de pesquisa como em rotinas de inspeção fitossanitária. A escolha do protocolo dependerá de recursos do laboratório, e da presença de sintomas no material vegetal. Uma sequência sugerida para triagem de um grande número de amostras, seria a cPCR com os *primers* específicos Xpig (protocolo de menor custo e com baixa taxa de falso positivo), seguida da confirmação apenas das amostras negativas por qPCR, o protocolo mais sensível, mas com maior custo. Ainda, deve-se considerar a possibilidade de se realizar o isolamento ou testes complementares em caso de ambiguidades, como por exemplo, material com sintomas, mas PCR negativa, ou resultados conflitantes entre cPCR e qPCR.

## 5. REFERÊNCIAS

- Araújo, J. S. P., Reis Júnior, F. B., Cruz, G. B., Oliveira, B. C., Robbs, C. F., Ribeiro, R. L. D., & Polidoro, J. C. (2005). Produção de anticorpos policlonais contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, *40*, 305-309.
- Ballard, E. L., Dietzgen, R. G., Sly, L. I., Gouk, C., Horlock, C., & Fegan, M. (2011). Development of a BIO-PCR protocol for the detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *Plant Disease*, *95*, 1109-1115.
- Bansal, K., Midha, S., Kumar, S., & Patil, P. B. (2017). Ecological and evolutionary insights into *Xanthomonas citri* pathovar diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, *83*, e02993-16.
- Bertolini, E., Felipe, R. T. A., Sauer, A. V., Lopes, S. A., Arilla, A., Vidal, E., & Cambra, M. (2014). Tissue-print and squash real-time PCR for direct detection of ‘*Candidatus Liberibacter*’ species in citrus plants and psyllid vectors. *Plant Pathology*, *63*, 1149-1158.
- Bull, C. T., & Koike, S. (2015). Practical benefits of knowing the enemy: modern molecular tools for diagnosing the etiology of bacterial diseases and understanding the taxonomy and diversity of plant-pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, *53*, 157-180.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, *12*, 13-15.
- Dreo, T., Gruden, K., Manceau, C., Janse, J.D., & Ravnkar, M. (2007). Development of a real time PCR based method for detection of *Xylophilus ampelinus*. *Plant Pathology*, *56*, 9-16.
- Ferreira, M. A. S. V., Bonneau, S., Briand, M., Cesbron, S., Portier, P., Darrasse, A., Gama, M. A. S., Barbosa, M. A. G., Mariano, R. L. R., Souza, E. B., & Jacques M-A. (2019). *Xanthomonas citri* pv. *viticola* affecting grapevine in Brazil: emergence of a successful monomorphic pathogen. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 489.

- Flores, C., Zarate, C., Triplett, L., Maillot-Lobon, V., Moufid, Y., Kanté, M., Bragard, C., Verdier, V., Gagnevin, L., Szurek, B., & Robène, I. (2019). Development of a duplex-PCR for differential diagnosis of *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* and *Xanthomonas cassavae* in cassava (*Manihot esculenta*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *105*, 34-46.
- Freitas, A. C. (2012). Detecção molecular de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videiras assintomáticas. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.
- Gama, M. A. S., Mariano, R. L. R., Silva Júnior, W. J., Farias, A. R. G., Barbosa, M. A. G., Ferreira, M. A. S. V., Costa Júnior, C. R. L., Santos, L. A., & Souza, E. B. (2018). Taxonomic repositioning of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 as *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 comb. nov. and emendation of the description of *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* to include pigmented isolates pathogenic to cashew plant. *Phytopathology*, *108*, 1143-1153.
- Janse, J. D., & Wenneker, M. (2002). Possibilities of avoidance and control of bacterial plant diseases when using pathogen-tested (certified) or -treated planting material. *Plant Pathology*, *51*, 523–536.
- Kado, C. I., & Heskett, M. G. (1970). Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, *60*, 969-976.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. I., & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids research*, *30*, 3059-3066.
- Kay, S., & Bonas, U. (2009). How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Current Opinion in Microbiology*, *12*, 37–43.

- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., & Thierer, T. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, *28*, 1647-1649.
- Lima, M. F., Ferreira, M. A. S. V., Moreira, A. W., & Dianese, J. C. (1999). Bacterial canker of grapevine in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, *24*, 440-444.
- Leite Júnior, R. P., Egel, D. S., & Stall, R. E. (1994a). Genetic analysis of *hrp*-related DNA sequences of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of citrus. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*, 1078-1086.
- Leite Júnior, R. P., Minsavage G. V., Bonas, U., & Stall, R. E. (1994b). Detection and identification of phytopathogenic *Xanthomonas* strains by amplification of DNA sequences related to the *hrp* genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*, 1068-1077.
- Llop, P., Caruso, P., Cubero, J., Morente, C., & López, M. M. (1999). A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods*, *37*, 23-31.
- Loreti, S., Cuntly, A., Pucci, N., Chabirand, A., Stefani, E., Abelleira, A., Balestra, G. M., Cornish, D.A., Gaffuri, F., Giovanardi, D., Gottsberg, R. A., Holeva, M., Karahan, A., Karagla, C. D., Mazzagli, A., Taylor, R., Cruz, L., Lopez, M. M., Vanneste, J. L., & Poliakoff, F. (2018). Performance of diagnostic tests for the detection and identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) from woody samples. *European Journal of Plant Pathology*, *152*, 657–676.
- Mavrodieva, V., Levy, L., & Gabriel, D. W. (2004). Improved sampling methods for real-time polymerase chain reaction diagnosis of citrus canker from field samples. *Phytopathology*, *94*, 61-68.



- Malavolta Júnior, V. A., Almeida, I. M. G., Sugimori, M. H., Ribeiro, I. J. A., Rodrigues Neto, J., Pires, E. J. P., & Nogueira, E. M. C. (1999). Occurrence of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* on grapevine in Brazil. *Summa Phytopathologica*, 25, 26-27.
- MAPA. (2014). Instrução Normativa N° 2, de 6 de fevereiro de 2014. [http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/sanidade-vegetal/arquivos-prevencao/IN2\\_2014CancrodaVideira.pdf](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/sanidade-vegetal/arquivos-prevencao/IN2_2014CancrodaVideira.pdf). Consultado em 09/07/2018.
- Midha, S., & Patil, P. B. (2014). Genomic insights into the evolutionary origin of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and its ecological relatives. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 6266-6279.
- Palacio-Bielsa, A., Cambra, M. A., & López, M. M. (2009). PCR detection and identification of plant-pathogenic bacteria: updated review of protocols (1989-2007). *Journal of Plant Pathology*, 91, 249-297.
- Palacio-Bielsa, A., Cubero, J., Cambra, M. A., Collados, R., Berruete, I. M., & López, M. M. (2011). Development of an efficient real-time quantitative PCR protocol for detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in *Prunus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 89-97.
- Parkinson, N., Cowie, C., Heeney, J., & Stead, D. (2009). Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 264-274.
- Peixoto, A. R., Mariano, R. L. R., & Viana, I. O. (2006). Semi-selective medium for isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Ciência Rural*, 36, 1317-1320.
- Robène, I., Perret, M., Jouen, E., Escalon, A., Maillot, M. V., Chabirand, A., & Pruvost, O. (2015). Development and validation of a real-time quantitative PCR assay to detect *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* from onion seed. *Journal of Microbiological Methods*, 114, 78-86.

- Roberts, P. D., Jones, J. B., Chandler, C. K., Stall, R. E., & Berger, R. D. (1996). Survival of *Xanthomonas fragariae* on strawberry in summer nurseries in Florida detected by specific primers and nested polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 80, 1283-1288.
- Rodrigues Neto, J., Destefano, S. A. L., Rodrigues, L. M. R., Pelloso, D. S., & Oliveira Júnior, L. C. (2011). Grapevine bacterial canker in the State of Sao Paulo, Brazil: detection and eradication. *Tropical Plant Pathology*, 36, 42-44.
- Rozen, S., & Skaletsky, H. J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. (In: S. Krawetz, & S. Misener (Eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (pp. 365-386). Totowa: Humana Press.)
- Schaad, N. W., & Frederick, R. D. (2002). Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24, 250-225.
- Schaad, N.W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. (St. Paul: APS Press)
- Singh, D., Raghavendra, B. T., Rathaur, P. S., Singh, H., Raghuwanshi, R., & Singh, R. P. (2014). Detection of black rot disease causing pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by BIO-PCR from seeds and plant parts of cole crops. *Seed Science and Technology*, 42, 36-46.
- Tostes, G. O., Araújo, J. S. P., Farias, A. R. G., Frade, D. A. R., & Olivares, F. (2014). Detection and cellular localization of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* in seeds of commercial 'Red Globe' grapes. *Tropical Plant Pathology*, 39, 134-140.
- Trindade, L. C., Marques, E., Lopes, D. B., & Ferreira, M. A. S. V. (2007). Development of a molecular method for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Summa Phytopathologica*, 33, 16-23.

- Trindade, L. C., Lima, M. F., & Ferreira, M. A. S. V. (2005). Molecular characterization of Brazilian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* by rep-PCR fingerprinting. *Fitopatologia Brasileira*, 30, 46-54.
- Vandroemme, J., Baeyen, S., Van Vaerenbergh J., De Vos, P., & Maes, M. (2008). Sensitive real-time PCR detection of *Xanthomonas fragariae* in strawberry plants. *Plant Pathology*, 57, 438-444.
- Vincelli, P., & Tisserat, N. (2008). Nucleic acid-based pathogen detection in applied plant pathology. *Plant Disease*, 92, 660-669.
- Wu, P. Y., Ho, L. C., Chang, J. J., Tzeng, K. C., Deng, W. L., & Lin, Y. H. (2017). Development of a TaqMan probe-based insulated isothermal PCR (TiiPCR) for the detection of *Acidovorax citrulli*, the bacterial pathogen of watermelon fruit blotch. *European Journal of Plant Pathology*, 47, 869–875.

**Tabela 1** Isolados bacterianos utilizados no estudo de detecção de *Xanthomonas citri* pv. *viticola*

Isolados	Hospedeira	Origem <sup>1</sup> e ano de coleta
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>viticola</i>		
NCPPB 2475 (LMG 965) <sup>T</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	Índia, 1972
A2, A3, A11, A12	<i>Vitis vinifera</i>	Petrolina – PE, 2010
AR1, AR2	<i>Vitis vinifera</i>	Petrolina – PE, 2012
AM 1, AM 2, AM 3	<i>Amaranthus</i> sp.	Petrolina – PE, 2012
P1S5, P1S6 (CFBP 7764), P1S9, P1S16	<i>Vitis vinifera</i>	Petrolina – PE, 2012
P2S1, P2S2, P2S4, P2S6	<i>Vitis vinifera</i>	Petrolina – PE, 2012
RS 2, RS 8, RS 10, RS 11	<i>Vitis vinifera</i>	Curaçá – BA, 2012
TR 1, TR 3	<i>Vitis vinifera</i>	Petrolina – PE, 2012
UnB 1183, UnB 1184, UnB 1188, UnB 1189, UnB 1190, UnB 1192, UnB 1193, UnB 1194	<i>Vitis vinifera</i>	Petrolina – PE, 1998
UnB 1205	<i>Vitis vinifera</i>	Sobradinho – BA, 2000
UnB 1307, UnB 1309, UnB 1313, UnB 1315	<i>Vitis vinifera</i>	Petrolina – PE, 2005
UnB 1318	<i>Vitis vinifera</i>	nd <sup>2</sup> , 2006
UnB 1429	<i>Vitis vinifera</i>	Petrolina – PE, 2016
Xcv 2	<i>Vitis vinifera</i>	Lagoa Grande- PE, 2008
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> UnB 1138	<i>Daucus carota</i>	nd, 1996
<i>Acidovorax citrulli</i> UnB 1232	<i>Cucumis melo</i>	Petrolina – PE, 2000
<i>Burkholderia cepacia</i> UnB 1134	<i>Allium sativum</i>	nd, 1996
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> UnB 1391	<i>Solanum lycopersicum</i>	Monte Alto – MG, 2014
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> UnB 1376	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Alto Paraíso – GO, 2013
<i>Dickeya chrysanthemi</i> UnB 336	<i>Beta vulgaris</i> var. <i>cicla</i>	nd, 1983
<i>Erwinia psidii</i> IBSBF 435 <sup>T</sup>	<i>Psidium guajava</i>	Valinhos – SP, 1982
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> UnB 1036	<i>Solanum lycopersicum</i>	Planaltina – DF, 1992
<i>Pseudomonas cichorii</i> UnB 1387	<i>Gerbera</i> sp.	Brazlândia – DF, 2013
<i>Pseudomonas corrugata</i> UnB 1142	<i>Solanum lycopersicum</i>	nd, 1996
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> UnB 853	<i>Solanum lycopersicum</i>	Vargem Bonita – DF, 1991
<i>Ralstonia solanacearum</i> UnB 1173	<i>Solanum lycopersicum</i>	Planaltina – DF, 1998
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> UnB 1111	<i>Manihot esculenta</i>	Paranavaí – PR, 1996
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> UnB 1395	<i>Passiflora edulis</i>	Vargem Bonita – DF, 2016
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> UnB 187	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Brasília – DF, 1981
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>ricini</i> UnB 607	<i>Ricinus communis</i>	Ibiapina – CE, 1985
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> UnB 1394	<i>Brassica oleracea</i>	Vargem Bonita – DF, 2016
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vitians</i> UnB 845	<i>Lactuca sativa</i>	Vargem Bonita – DF, 1991
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i> UnB 92	<i>Citrus</i> sp.	nd
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>fuscans</i> UnB 773	<i>Phaseolus vulgaris</i>	nd, 1990
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>malvacearum</i> UnB 87	<i>Gossypium</i> sp.	Planaltina – DF, 1980
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> UnB 764	<i>Mangifera indica</i>	Planaltina – DF, 1990
<i>Xanthomonas cucurbitae</i> UnB 1080	<i>Cucumis sativus</i>	Vargem Bonita – DF, 1995
Bactérias não patogênicas associadas à videira		
2 isolados	<i>Vitis vinifera</i>	Brasília – DF, 2016
29 isolados	<i>Vitis vinifera</i>	Petrolina – PE, 2016
10 isolados	<i>Vitis</i> spp.	Petrolina – PE, 2016

<sup>1</sup>PE, estado de Pernambuco; BA, Bahia; MG, Minas Gerais; GO, Goiás; SP, São Paulo; DF, Distrito Federal; PR, Paraná.

<sup>2</sup>nd, informação não disponível.

**Tabela 2** *Primers* utilizados no estudo de detecção de *Xanthomonas citri* pv. *viticola*

<i>Primers</i> <sup>1</sup>	Sequência, 5' - 3'	T <sub>m</sub> <sup>2</sup>	Combinação	Alvo	<i>Amplicon</i> (pb)
Xcv 4F	ATTGAACAACCCATGCCGAC	53	Xcv4F/Xcv5R	<i>hrpB</i>	126
Xcv 5R	CTCGGGCGAATTCCATCAAG	53			
Xcv 6F	TATGGCAAGGTGGTCTGAACT	53	Xcv6F/Xcv7R	<i>hrpB</i>	108
Xcv 7R	CTGCAACAAGGTGCCATCG	54			
<b>Xcv 8F</b>	<b>CGGCTGATTGAACAACCCAT</b>	53	<b>Xcv8F/Xcv9R</b>	<i>hrpB</i>	118
<b>Xcv 9R</b>	<b>ATCAAGGTGCTCTGCCGAC</b>	54			
<b>Xcv 10F</b>	<b>GTCATTCCGCCGCGTGTG</b>	55	<b>Xcv10F/Xcv3R</b>	<i>hrpB</i>	132
<b>Xcv 3R</b>	<b>AGTTCGACCACCTTGCCATA</b>	53			
Xcv 11F	CTGATTGAACAACCCATGCC	52	Xcv11F/Xcv12R	<i>hrpB</i>	130
Xcv 12R	GCTCGGGCGAATTCCATC	53			
<b>Xcv 1F</b>	<b>TGCAGGTGAGCTGTGC</b>	51	<b>Xcv1F/Xcv13R</b>	<i>hrpB</i>	129
<b>Xcv 13R</b>	<b>CAACACGCGGCGAATGAC</b>	55			
Xcv14F	CGTCGGCGGCTGATTGAACA	58	Xcv14F/Xcv15R	<i>hrpB</i>	140
Xcv 15R	TGCTCGGGCGAATTCCATCAA	57			
<b>Xcv 16F</b>	<b>TCAGCCGCGATCTCGCATTG</b>	58	<b>Xcv16F/Xcv17R</b>	<i>hrpB</i>	117
<b>Xcv 17R</b>	<b>CCAACAAGGCCGGTCCAACA</b>	57			
<b>Xcv 18F</b>	<b>AGACGCGCGTGATCGGATTG</b>	58	<b>Xcv18F/Xcv19R</b>	<i>hrpB</i>	118
<b>Xcv 19R</b>	<b>TCGCAGGCGATTGCTCCTTG</b>	58			
<b>Xcv 20F</b>	<b>GAACTCGTCGGCACCATGCTCA</b>	59	<b>Xcv20F/Xcv21R</b>	<i>hrpB</i>	102
<b>Xcv 21R</b>	<b>TTCGGCACGCTGCAACAAGG</b>	59			
<b>Xpig 1F</b>	<b>GCATGCAGCTTATGACGGTG</b>	55	<b>Xpig1F/Xpig1R</b>	xantomonadina	205
<b>Xpig 1R</b>	<b>CAGGGCGAGGACAGCAAT</b>	56			
<b>Xpig 2F</b>	<b>TACGAACGCTGCCCTTGAAG</b>	55	<b>Xpig2F/Xpig1R</b>	xantomonadina	166

<sup>1</sup> Pares de *primers* selecionados para os ensaios de PCR estão em negrito.<sup>2</sup> Temperatura de *melting*.

**Tabela 3** Caracterização cultural e bioquímica de bactérias não patogênicas associadas a folhas e pecíolos de videira

Isolado	Hospedeira <sup>1</sup>	Coloração da colônia	KOH <sup>2</sup>	Catalase <sup>3</sup>	Oxidase <sup>4</sup>	O/F <sup>5</sup>	King's B <sup>6</sup>	Asparagina <sup>7</sup>	NYDAM <sup>8</sup>	Hidrólise Amido <sup>9</sup>	Hidrólise Gelatina <sup>10</sup>
1	Sugraone	Creme	+ <sup>11</sup>	+	-	Oxidativa	-	-	-	+	-
2	Thompson Seedless	Amarela	- <sup>12</sup>	-	-	Fermentativa	-	+	-	-	-
3	Híbrido	Branca	+	+	-	Fermentativa	-	+	-	+	-
4	Híbrido	Creme	+	+	-	Oxidativa	-	-	+	+	-
5	Híbrido	Branca	+	+	-	Fermentativa	-	+	-	-	-
6	Híbrido	Creme	+	-	-	Fermentativa	-	+	-	+	-
7	Híbrido	Amarela	-	+	-	Fermentativa	-	+	+	-	-
8	Híbrido	Creme	+	+	+	Oxidativa	+	+	+	+	-
9	Híbrido	Amarela	-	+	-	Fermentativa	-	+	+	+	-
10	Híbrido	Branca	+	+	-	Fermentativa	-	+	+	+	+
11	Híbrido	Branca	-	+	-	Fermentativa	-	+	+	+	+
12	Híbrido	Branca	-	+	-	Fermentativa	-	+	+	+	+
13	BRS Núbia	Branca	-	+	-	Fermentativa	-	+	+	+	-
14	BRS Núbia	Rosa	+	+	+	Oxidativa	-	+	+	+	-
15	BRS Núbia	Amarela	+	+	-	Fermentativa	-	+	+	-	+
16	BRS Núbia	Amarela	+	+	-	Fermentativa	-	+	+	-	+
17	BRS Núbia	Branca	-	+	-	Fermentativa	-	+	+	+	+
18	BRS Núbia	Branca	-	+	-	Fermentativa	-	+	+	+	+
19	BRS Núbia	Branca	-	+	-	Fermentativa	-	+	+	+	+
20	BRS Núbia	Amarela	+	+	-	Fermentativa	-	+	+	-	-
21	BRS Núbia	Branca	+	+	-	Oxidativa	-	+	+	+	+
22	BRS Núbia	Branca	-	+	-	Fermentativa	-	+	+	+	+
23	BRS Núbia	Branca	-	+	-	Fermentativa	-	+	+	+	+
24	BRS Núbia	Branca	-	+	-	Fermentativa	-	+	+	-	+
25	Red Globe	Branca	-	+	-	Fermentativa	-	+	+	+	+
26	Red Globe	Branca	-	+	-	Oxidativa	-	+	+	+	-
27	Red Globe	Laranja	-	+	-	Fermentativa	-	+	+	+	-

**Tabela 3 (Continuação)**

Isolado	Hospedeira <sup>1</sup>	Coloração da colônia	KOH <sup>2</sup>	Catalase <sup>3</sup>	Oxidase <sup>4</sup>	O/F <sup>5</sup>	King's B <sup>6</sup>	Asparagina <sup>7</sup>	NYDAM <sup>8</sup>	Hidrólise Amido <sup>9</sup>	Hidrólise Gelatina <sup>10</sup>
28	Red Globe	Creme	+	+	+	Fermentativa	-	+	+	-	-
29	Crimson	Amarela	+	+	-	Fermentativa	-	+	+	-	+
30	Crimson	Amarela	+	+	-	Oxidativa	-	-	+	-	+
31	BRS Magna	Branca	-	+	-	Fermentativa	-	+	+	+	+
32	BRS Magna	Creme	-	+	-	Fermentativa	-	-	+	-	-
33	BRS Magna	Amarela	-	+	-	Fermentativa	-	-	+	+	-
34	Red Globe	Branca	-	+	-	Fermentativa	-	+	+	+	+
35	Red Globe	Creme	+	+	-	Oxidativa	-	+	+	+	-
36	BRS Vitória	Branca	-	+	-	Fermentativa	-	+	+	+	-
37	CNPUV 25	Branca	+	+	-	Fermentativa	-	+	+	+	+
38	CNPUV 25	Branca	-	+	-	Fermentativa	-	+	+	+	+
39	Thompson Seedless	Branca	-	+	-	Fermentativa	-	+	+	+	+
40	Thompson Seedless	Creme	+	+	+	Oxidativa	+	+	+	+	-
41	BRS Santa Clara	Creme	+	+	-	Fermentativa	-	+	+	+	-

<sup>1</sup> Variedade de origem do isolado.

<sup>2</sup> Teste de solubilidade em KOH a 3%.

<sup>3</sup> Teste para presença de catalase.

<sup>4</sup> Teste para presença de oxidase.

<sup>5</sup> Teste para oxidação x metabolismo de glicose.

<sup>6</sup> Teste para a produção de pigmento fluorescente em meio King's B.

<sup>7</sup> Crescimento em meio contendo asparagina como fonte única de carbono.

<sup>8</sup> Crescimento em meio NYDAM (Peixoto et al., 2006).

<sup>9</sup> Teste para hidrólise de amido.

<sup>10</sup> Teste para hidrólise de gelatina.

<sup>11</sup> (+) Positivo

<sup>12</sup> (-) Negativo

**Tabela 4** Parâmetros de desempenho da PCR em tempo real (SYBR® Green), com o par de *primers* Xcv18F/19R, avaliados através de curvas padrão geradas a partir de diluições seriadas (1:10) de DNA genômico (1,5 pg  $\mu\text{l}^{-1}$  a 150 fg  $\mu\text{l}^{-1}$ ) e de suspensão bacteriana ( $10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  a 1 UFC  $\text{ml}^{-1}$ ) de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Xcv)

Molde	<sup>1</sup> E (%)	<sup>2</sup> R <sup>2</sup>	<sup>3</sup> Slope	<sup>4</sup> Y = int
gDNA Xcv	99,16	0,996	3,342	25,827
gDNA Xcv	94,98	0,990	3,448	26,678
Suspensão Xcv	92,87	0,995	3,506	44,310
Suspensão Xcv	92,54	0,994	3,515	44,428

<sup>1</sup> E = Eficiência da PCR.

<sup>2</sup> R<sup>2</sup> corresponde ao coeficiente de correlação da regressão linear, indica o quanto os valores medidos das diluições em série se ajustam a curva padrão, ou seja, reflete a linearidade da curva; O valor de R<sup>2</sup> deve ser maior ou igual a 0,985, sendo 1 o valor máximo teórico.

<sup>3</sup> Slope é o coeficiente angular (a) da equação referente à curva padrão ( $y=ax+b$ ).

<sup>4</sup> Y = int representa o valor de Ct em que a curva padrão cruza o eixo y.

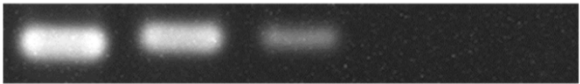
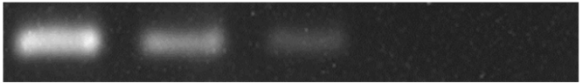
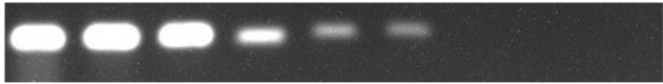
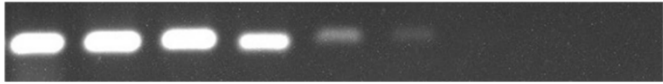


**Tabela 5** Especificidade de *primers* desenhados e selecionados para detecção de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* em videira

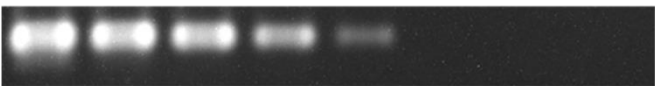
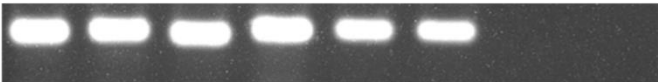
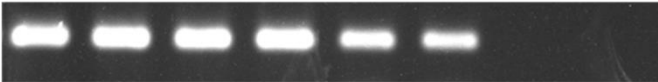
Isolados	Xcv1F/13R	Xcv8F/9R	Xcv10F/3R	Xcv16F/17R	Xcv18F/19R	Xcv20F/21R	Xpig1F/1R	Xpig2F/1R
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>viticola</i> <sup>1,2</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> UnB 1111 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> UnB 1395	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> UnB 187	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>ricini</i> UnB 607 <sup>2</sup>	-	+	+	-	+	+	-	-
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> UnB 1394	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vitians</i> UnB 845	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i> UnB 92	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>fuscans</i> UnB 773	+	-	+	-	+	+	-	-
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>malvacearum</i> UnB 87	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> UnB 764 <sup>2</sup>	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Xanthomonas cucurbitae</i> UnB 1080	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> UnB 1138	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acidovorax citrulli</i> UnB 1232	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Burkholderia cepacia</i> UnB 1134	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> UnB 1391	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> UnB 1376	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dickeya chrysanthemi</i> UnB 336	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Erwinia psidii</i> IBSBF 435	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> UnB 1036	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas cichorii</i> UnB 1387	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas corrugata</i> UnB 1142	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> UnB 853	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ralstonia solanacearum</i> UnB 1173	-	-	-	-	-	-	-	-
Bactérias não patogênicas associadas à videira <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>1</sup> Todos os isolados de Xcv utilizados no estudo (Tabela 1); <sup>2</sup> Isolados de *Xanthomonas* que produzem colônias brancas; <sup>3</sup> (+) amplificação positiva. <sup>4</sup> (-) amplificação negativa; <sup>5</sup> Todos os isolados de bactérias não patogênicas associadas à videira utilizados neste estudo (Tabelas 1 e 3).

**Tabela 6** Sensibilidade de detecção de DNA genômico (parte superior) e suspensão bacteriana (parte inferior) de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (UnB 1188) por PCR convencional (cPCR) e PCR em tempo real (qPCR). Os valores Ct indicados em qPCR referem-se a média de dois ensaios independentes

PCR	Primers	DNA ( [ ] $\mu\text{l}^{-1}$ )									
		1,5 ng	150 pg	15 pg	1,5 pg	150 fg					
qPCR	Xcv 18F/19R	25,63	29,06	32,54	35,56	-					
cPCR	Xcv18F/19R										
	Xpig2F/1R										
PCR	Primers	UFC $\text{ml}^{-1}$									
		$10^8$	$10^7$	$10^6$	$10^5$	$10^4$	$10^3$	$10^2$	$10^1$	1	
qPCR	Xcv 18F/19R	16,20	19,21	23,59	27,38	30,54	33,90	36,59	-	-	
cPCR	Xcv18F/19R										
	Xpig2F/1R										

**Tabela 7** Limiar de detecção de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (UnB 1188) em extratos de folhas de videira misturados à suspensão bacteriana, por PCR convencional (cPCR) e PCR em tempo real (qPCR), após extração de DNA total (parte superior) e enriquecimento por 72h em meio semisseletivo NYDAM (parte inferior). Os valores Ct indicados em qPCR referem-se a média de dois ensaios independentes

PCR	Primers	UFC ml <sup>-1</sup>							
		10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	1
qPCR	Xcv 18F/19R	19,45	22,46	25,86	29,55	32,96	35,83	-	-
cPCR	Xcv18F/19R								
	Xpig2F/1R								
PCR	Primers	UFC ml <sup>-1</sup>							
		10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	1
qPCR	Xcv 18F/19R	17,00	17,70	20,12	20,42	21,14	22,64	34,42	-
cPCR	Xcv18F/19R								
	Xpig2F/1R								

**Tabela 8** Detecção de *Xanthomonas citri* pv. *viticola*, por PCR, em folhas de videira sintomáticas coletadas em área de ocorrência do cancro bacteriano em Petrolina, PE

<b>Variedade</b>	<b>Local</b>	<b>qPCR <sup>1</sup> (Ct <sup>2</sup>)</b>	<b>cPCR <sup>3</sup></b>
Benitaka	Campo	1/1 (20,39)	1/1
BRS Isis	Campo	1/1 (18,75)	1/1
BRS Linda	Campo	5/5 (21,22)	5/5
BRS Núbia	Campo	2/2 (18,98)	2/2
BRS Vitória	Campo	2/2 (19,74)	2/2
Crimson	Campo	2/2 (19,41)	2/2
Itália	Campo	1/1 (19,20)	1/1
Niagara Rosada	Campo	1/1 (18,87)	1/1
Red Globe	Campo	6/6 (20,32)	6/6
Sugraone	Campo	1/1 (20,94)	1/1
Thompson Seedless	Campo	3/3 (22,10)	3/3
Híbridos	Casa de vegetação	10/10 (22,57)	10/10
Red Globe	Casa de vegetação	1/1 (19,70)	1/1
<b>Total</b>		<b>36/36</b>	<b>36/36</b>

<sup>1</sup> Número de amostras positivas por PCR em tempo real com o par de *primers* Xcv18F/19R / número total de amostras testadas.

<sup>2</sup> Ct (*cycle threshold*): média geral das amostras positivas de cada variedade.

<sup>3</sup> Número de amostras positivas por PCR convencional com o par de *primers* Xpig2F/1R / número total de amostras testadas.

**Tabela 9** Detecção de *Xanthomonas citri* pv. *viticola*, por PCR, em amostras de videira e de *Amaranthus* sp., assintomáticas, coletadas em área de ocorrência do cancro bacteriano em Petrolina, PE

Variedade	Local	Amostra	qPCR <sup>1</sup> (Ct <sup>2</sup> )	cPCR <sup>3</sup>
Benitaka	Campo	Folha	2/2 (27,84)	2/2
Brasil	Campo	Folha	2/2 (26,05)	2/2
BRS Cora	Campo	Folha	4/4 (22,60)	4/4
BRS Isis	Campo	Folha	4/4 (23,19)	4/4
BRS Linda	Campo	Folha	2/2 (24,81)	2/2
BRS Magna	Campo	Folha	7/7 (22,47)	7/7
BRS Núbia	Campo	Folha	2/2 (22,16)	2/2
BRS Vitória	Campo	Folha	1/1 (25,70)	1/1
Crimson	Campo	Folha	1/1 (17,51)	1/1
IAC 572	Campo	Folha	2/2 (22,50)	2/2
Isabel	Campo	Folha	5/5 (28,52)	5/5
Isabel Muscat	Campo	Folha	3/3 (23,32)	3/3
Itália	Campo	Folha	2/2 (26,38)	2/2
Niagara Rosada	Campo	Folha	4/4 (26,14)	4/4
Red Globe	Campo	Folha	1/1 (19,83)	1/1
Sugraone	Campo	Folha	3/3 (20,26)	3/3
Thompson Seedless	Campo	Folha	3/3 (24,09)	3/3
Red Globe	Campo	Raiz <sup>4</sup>	9/12 (28,10)	6/12
<i>Amaranthus</i> sp. <sup>5</sup>	Campo	Folha	2/2 (26,54)	2/2
Híbridos	Casa de vegetação	Folha	12/13 (21,16)	12/13
IAC 313	Casa de vegetação	Folha	0/1 (nd) <sup>6</sup>	0/1
<b>Total</b>			<b>71/76</b>	<b>68/76</b>

<sup>1</sup> Número de amostras positivas por PCR em tempo real com o par de *primers* Xcv18F/19R / número total de amostras testadas.

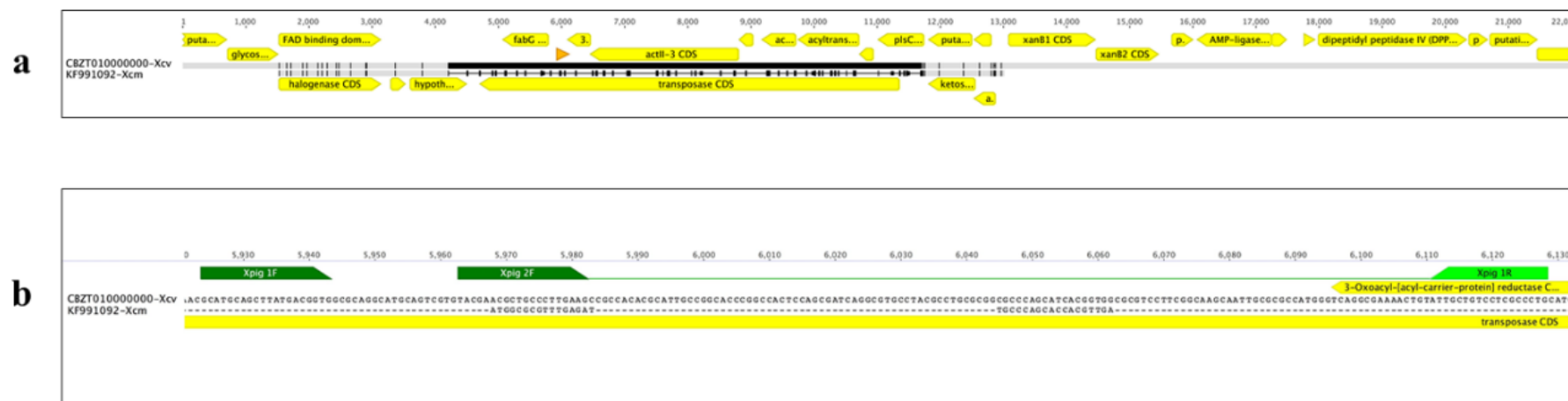
<sup>2</sup> Ct (*cycle threshold*): média geral das amostras positivas de cada variedade.

<sup>3</sup> Número de amostras positivas por PCR convencional com o par de *primers* Xpig2F/1R / número total de amostras testadas.

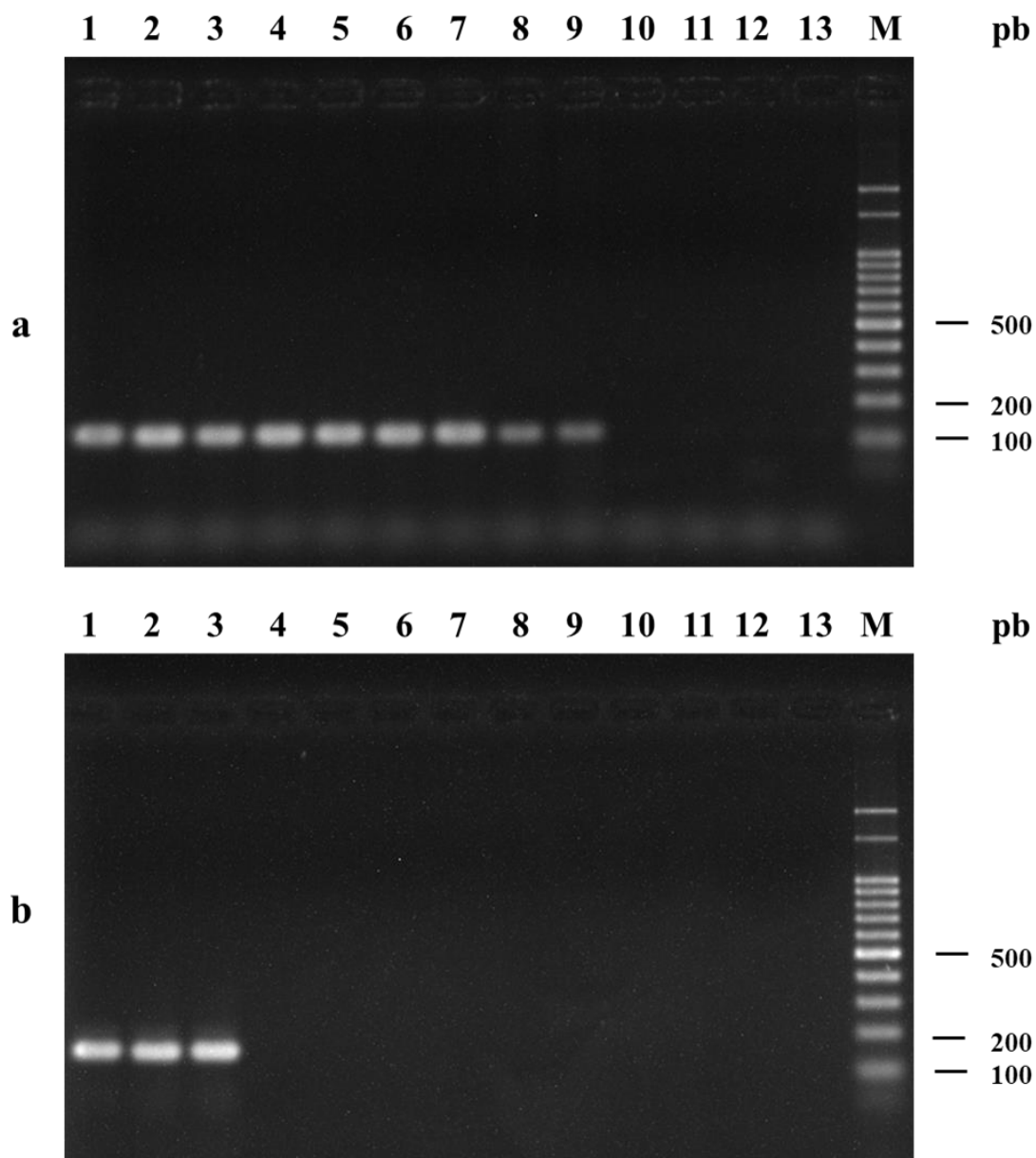
<sup>4</sup> Amostras de raízes coletadas de videiras com sintomas severos de cancro bacteriano.

<sup>5</sup> Hospedeira alternativa.

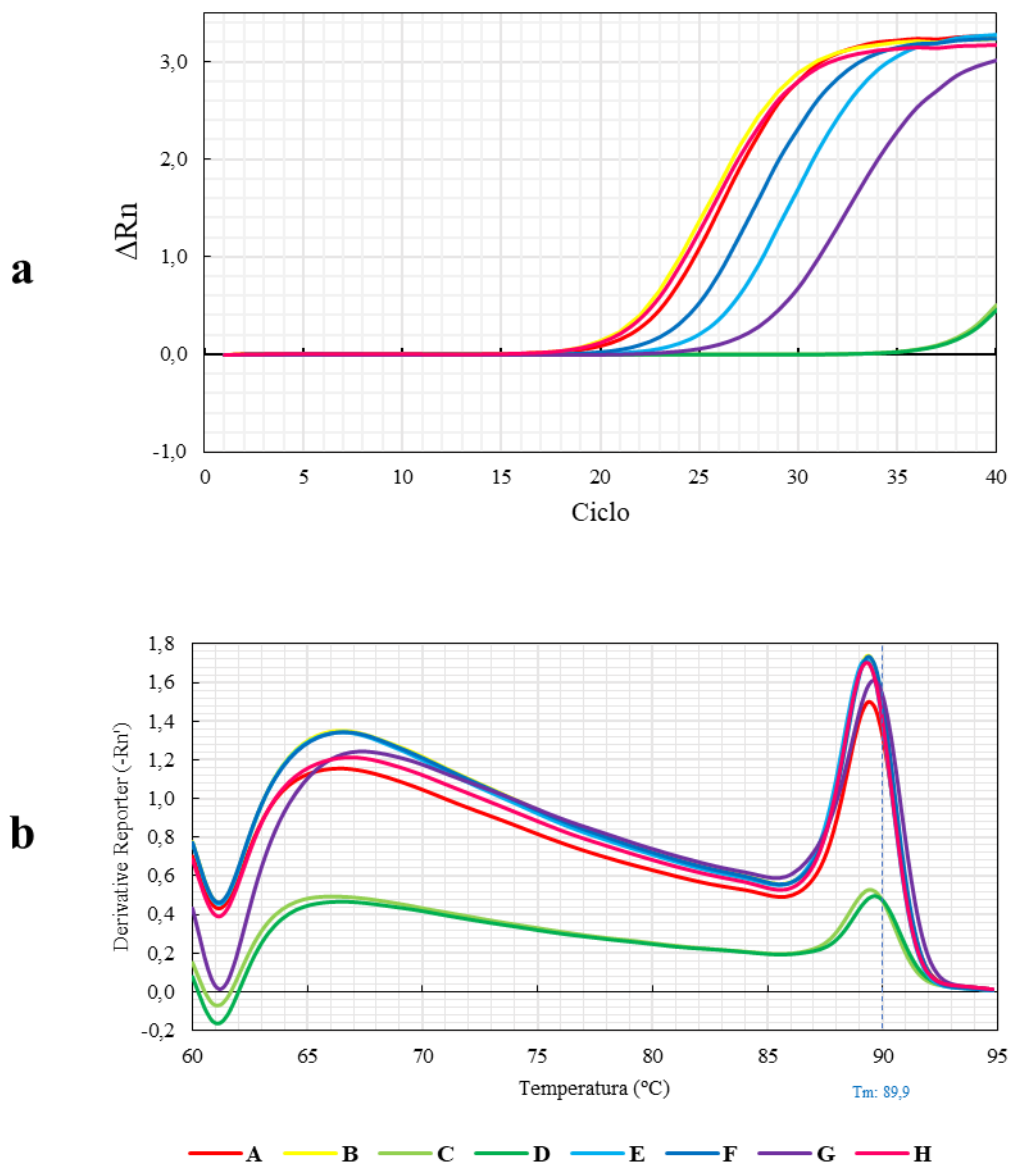
<sup>6</sup> nd, não detectado (Ct indeterminado).



**Figura 1.** Localização dos primers Xpig em alinhamento do cluster da xantomonadina de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (acesso CBZT010000000) e *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* (KF991092). (a) Visão geral da localização dos primers forward Xpig em uma região intergênica de *X. citri* pv. *viticola* e a presença de um transposon em *X. citri* pv. *mangiferaeindicae*. (b) Visão ampliada da localização dos primers Xpig, mostrando nenhuma identidade com *X. citri* pv. *mangiferaeindicae*.

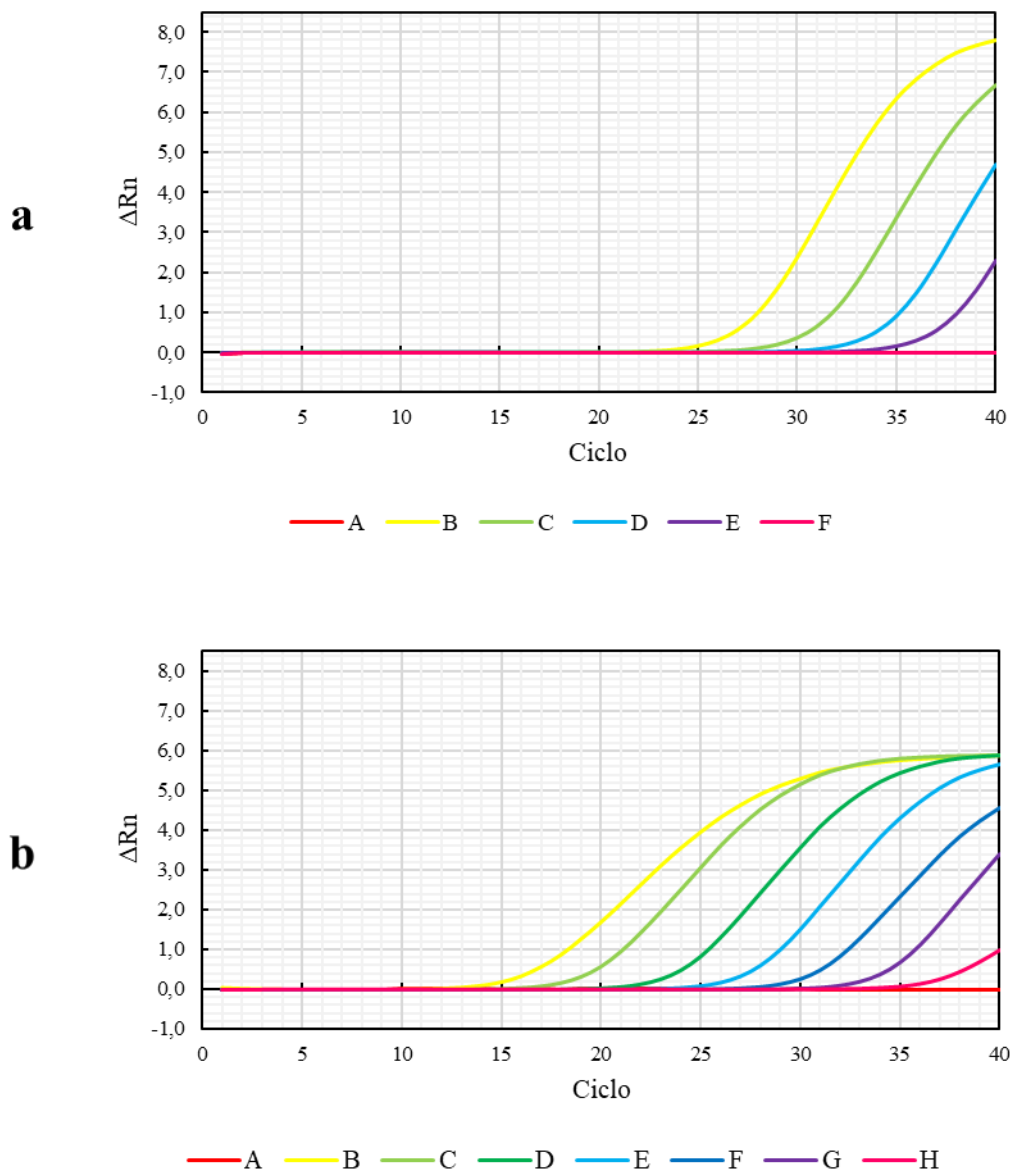


**Figura 2.** Especificidade dos pares de *primers* Xcv18F/19R (a) e Xpig2F/1R (b) para detecção e identificação de *Xanthomonas citri* pv. *viticola*. Linhas 1: NCPPB 2475; 2: UnB 1188; 3: UnB 1205; 4: UnB 92; 5: UnB 764; 6: UnB 773; 7: UnB 607; 8: UnB 1395; 9: UnB 187; 10-11: Bactérias epifíticas e/ou endofíticas da videira; 12: DNA de videira; 13: Controle Negativo PCR; M: Marcador 100 pb (Ludwig) Linhas 1-3: *Xanthomonas citri* pv. *viticola*; 4: *X. citri* pv. *citri*; 5: *X. citri* pv. *mangiferaeindicae*; 6: *X. citri* pv. *fuscans*; 7: *X. axonopodis* pv. *ricini*; 8: *X. axonopodis* pv. *passiflorae*; 9: *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

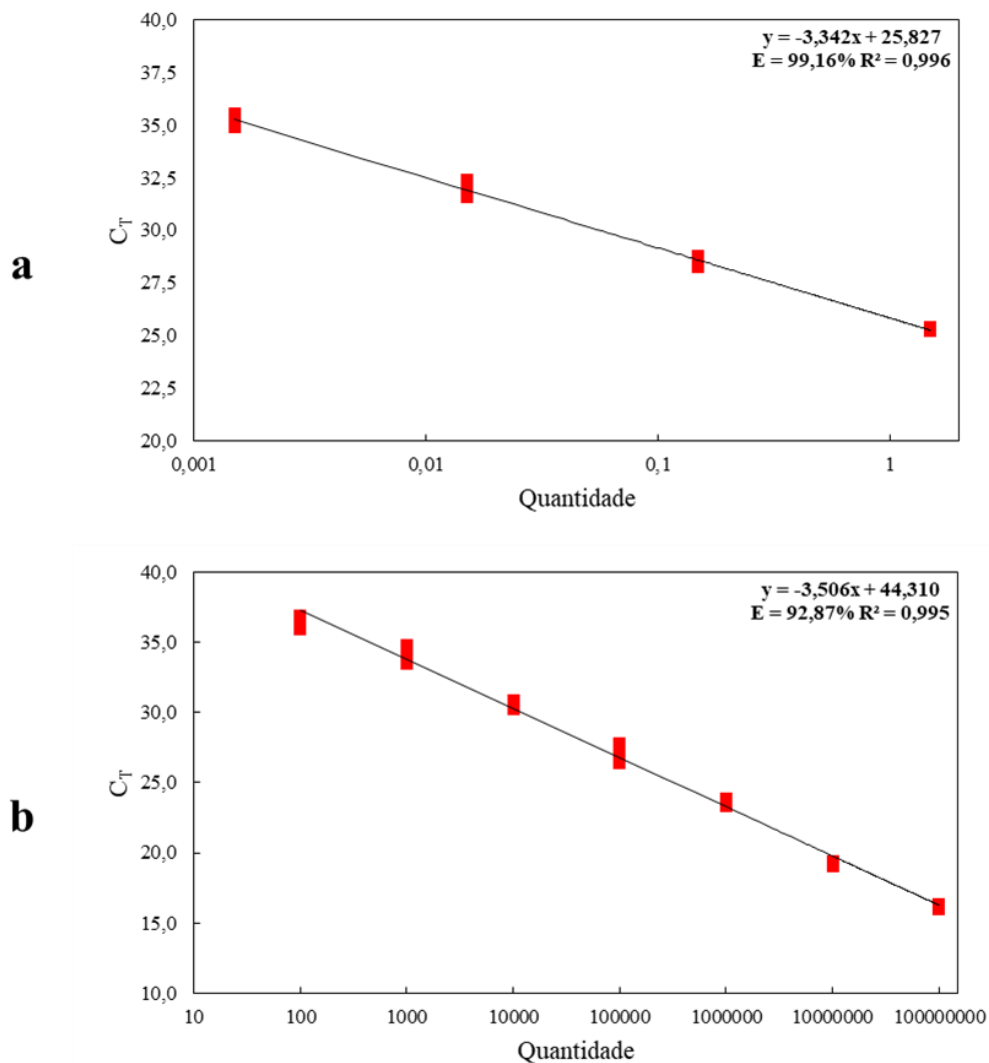


**Figura 3.** PCR em tempo real (SYBR<sup>®</sup> Green) com o par de *primers* Xcv18R/19F, utilizando como molde DNA genômico ( $5 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ ) de diferentes espécies de *Xanthomonas*. (a) Curvas de amplificação. (b) Curvas de *melting*. Legenda: A - *X. citri* pv. *viticola* (UnB 1188); B - *X. citri* pv. *viticola* (NCPB 2475); C - *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (UnB 1395); D - *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (UnB 187). E - *X. axonopodis* pv. *ricini* (UnB 607); F - *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* (UnB 764); G - *X. citri* pv. *fuscans* (UnB 773); H - *X. citri* pv. *citri* (UnB 92).





**Figura 4.** Curvas de amplificação da PCR em tempo real (SYBR<sup>®</sup> Green) com o par de *primers* Xcv18F/19R, para detecção de (a) DNA genômico ( $1,5 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  a  $150 \text{ fg } \mu\text{l}^{-1}$ ) e (b) suspensão bacteriana ( $10^8$  a  $1 \text{ UFC ml}^{-1}$ ) de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (UnB 1188). Legenda (a): A - Controle Negativo (água destilada esterilizada); B -  $1,5 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ ; C -  $150 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$ ; D -  $15 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$ ; E:  $1,5 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$ ; F:  $150 \text{ fg } \mu\text{l}^{-1}$ . Legenda (b): Controle Negativo (água destilada esterilizada); B -  $10^8 \text{ UFC ml}^{-1}$ ; C -  $10^7 \text{ UFC ml}^{-1}$ ; D -  $10^6 \text{ UFC ml}^{-1}$ ; E -  $10^5 \text{ UFC ml}^{-1}$ ; F -  $10^4 \text{ UFC ml}^{-1}$ ; G -  $10^3 \text{ UFC ml}^{-1}$ ; H  $10^2 \text{ UFC ml}^{-1}$ .



**Figura 5.** Curvas padrão gerada por PCR em tempo real (SYBR<sup>®</sup> Green) com o par de *primers* Xcv18F/19R, para detecção de (a) DNA genômico (1,5 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  a 150 fg  $\mu\text{l}^{-1}$ ) e (b) suspensão bacteriana ( $10^8$  a 1 UFC  $\text{ml}^{-1}$ ) de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (UnB 1188).

## 6. ANEXOS

**Tabela A1** Sensibilidade por PCR em tempo real (SYBR® Green) com o par de *primers* Xcv18F/19R, para detecção de DNA genômico de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (UnB 1188)

DNA [ ] $\mu\text{l}^{-1}$	Ensaio 1	Ensaio 2	Média
1,5 ng	25,91 $\pm$ 0,15	25,31 $\pm$ 0,07 <sup>1</sup>	25,63 $\pm$ 0,42
150 pg	29,72 $\pm$ 0,48	28,49 $\pm$ 0,14	29,06 $\pm$ 0,87
15 pg	33,05 $\pm$ 0,11	31,96 $\pm$ 0,28	32,54 $\pm$ 0,77
1,5 pg	35,97 $\pm$ 0,39	35,29 $\pm$ 0,32	35,56 $\pm$ 0,48
150 fg	- <sup>2</sup>	-	-

<sup>1</sup> Valores de Ct (*cycle threshold*).

<sup>2</sup> (-), ausência de fluorescência acima da linha de *threshold* (Ct intederminado).

**Tabela A2** Sensibilidade por PCR em tempo real (SYBR® Green) com o par de *primers* Xcv18F/19R, para detecção de suspensão bacteriana de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (UnB 1188)

UFC ml <sup>-1</sup>	Ensaio 1	Ensaio 2	Média
10 <sup>8</sup>	16,19 $\pm$ 0,11 <sup>1</sup>	16,20 $\pm$ 0,06	16,20 $\pm$ 0,01
10 <sup>7</sup>	19,22 $\pm$ 0,11	19,19 $\pm$ 0,07	19,21 $\pm$ 0,02
10 <sup>6</sup>	23,57 $\pm$ 0,16	23,61 $\pm$ 0,16	23,59 $\pm$ 0,03
10 <sup>5</sup>	27,20 $\pm$ 0,44	27,57 $\pm$ 0,35	27,38 $\pm$ 0,26
10 <sup>4</sup>	30,55 $\pm$ 0,24	30,53 $\pm$ 0,23	30,54 $\pm$ 0,01
10 <sup>3</sup>	34,02 $\pm$ 0,48	33,69 $\pm$ 0,15	33,90 $\pm$ 0,23
10 <sup>2</sup>	36,55 $\pm$ 0,33	36,66 $\pm$ 0,22	36,59 $\pm$ 0,08
10	- <sup>2</sup>	-	-
1	-	-	-

<sup>1</sup> Valores de Ct (*cycle threshold*).

<sup>2</sup> (-), ausência de fluorescência acima da linha de *threshold* (Ct intederminado).

**Tabela A3** Sensibilidade por PCR em tempo real (SYBR® Green) com o par de *primers* Xcv18F/19R, para detecção de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (UnB 1188) em DNA total extraído da mistura de extratos de folhas de videiras sadias e suspensão bacteriana

UFC ml <sup>-1</sup>	Ensaio 1	Ensaio 2	Média
10 <sup>7</sup>	19,49 ± 0,09 <sup>1</sup>	19,41 ± 0,31	19,45 ± 0,06
10 <sup>6</sup>	22,75 ± 0,23	22,21 ± 0,40	22,46 ± 0,38
10 <sup>5</sup>	26,47 ± 0,23	25,33 ± 0,22	25,86 ± 0,81
10 <sup>4</sup>	29,94 ± 0,21	29,09 ± 0,29	29,55 ± 0,60
10 <sup>3</sup>	33,48 ± 0,33	32,45 ± 0,26	32,96 ± 0,73
10 <sup>2</sup>	36,82 ± 0,26	34,83 ± 0,55	35,83 ± 1,41
10	- <sup>2</sup>	-	-
1	-	-	-

<sup>1</sup> Valores de Ct (*cycle threshold*).

<sup>2</sup> (-), ausência de fluorescência acima da linha de *threshold* (Ct intederminado).

**Table A4** Sensibilidade por PCR em tempo real (SYBR® Green) utilizando o par de *primers* Xcv18F/19R, para detecção de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (UnB 1188) em extratos de folhas de videiras sadias misturadas à suspensão bacteriana, após enriquecimento por 72h em meio semisseletivo (NYDAM)

UFC ml <sup>-1</sup>	Ensaio 1	Ensaio 2	Média
10 <sup>7</sup>	16,75 ± 0,28 <sup>1</sup>	17,23 ± 0,78	17,00 ± 0,34
10 <sup>6</sup>	17,83 ± 0,91	17,58 ± 0,56	17,70 ± 0,18
10 <sup>5</sup>	19,98 ± 0,57	20,26 ± 0,51	20,12 ± 0,20
10 <sup>4</sup>	20,16 ± 0,28	20,67 ± 0,33	20,42 ± 0,37
10 <sup>3</sup>	21,24 ± 0,31	21,04 ± 0,63	21,14 ± 0,14
10 <sup>2</sup>	22,32 ± 0,61	22,97 ± 0,40	22,64 ± 0,46
10	34,59 ± 0,65	34,25 ± 0,36	34,42 ± 0,24
1	- <sup>2</sup>	-	-

<sup>1</sup> Valores de Ct (*cycle threshold*).

<sup>2</sup> (-), ausência de fluorescência acima da linha de *threshold* (Ct intederminado).

**Tabela A5** Detecção de *Xanthomonas citri* pv. *viticola*, por isolamento em meio NYDAM, PCR convencional (cPCR) e PCR em tempo real (qPCR), em amostras de videira e *Amaranthus* sp. coletadas em Petrolina, PE, em maio de 2018.

ID amostra	Data da coleta	Local	Amostra	Variedade	Amostra com sintoma		Data do processamento	Isolamento	qPCR (Média Ct)	cPCR
					Sim	Não				
1	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	Red Globe	X		22/05/2018	+ <sup>3</sup>	18,82	+
2	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Raiz	Red Globe		X	21/05/2018	nr	25,30	+
3	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	Red Globe	X		22/05/2018	- <sup>4</sup>	19,55	+
4	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	Red Globe	X		22/05/2018	+	18,96	+
5	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	Thompson Seedless		X	21/05/2018	nr	23,98	+
6	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	Thompson Seedless	X		22/05/2018	+	24,29	+
7	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	Red Globe	X		22/05/2018	+	27,83	+
8	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	BRS Linda	X		22/05/2018	+	20,72	+
9	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	BRS Isis		X	21/05/2018	nr	20,18	+
10	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	Crimson	X		22/05/2018	+	20,22	+
11	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	Benitaka		X	21/05/2018	nr	29,80	+
12	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	Isabel		X	21/05/2018	nr	34,27	+
14	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	BRS Vitoria	X		22/05/2018	+	20,26	+
15	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	Itália		X	21/05/2018	nr	21,92	+
16	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	Isabel Muscat		X	21/05/2018	nr	25,22	+
17	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	BRS Nubia		X	21/05/2018	nr	24,20	+
18	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	BRS Nubia	X		22/05/2018	+	20,17	+

ID amostra	Data da coleta	Local	Amostra	Variedade	Amostra com sintoma		Data do processamento	Isolamento	qPCR (Média Ct)	cPCR
					Sim	Não				
19	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	BRS Magna		X	21/05/2018	nr	26,81	+
20	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	Red Globe	X		22/5/2018	+	19,64	+
21	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	BRS Magna		X	21/05/2018	nr	20,72	+
23	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	BRS Magna		X	21/05/2018	nr	22,79	+
25	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	BRS Cora		X	21/05/2018	nr	22,24	+
28	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	BRS Isis		X	21/05/2018	nr	23,36	+
30	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	Isabel		X	21/05/2018	nr	27,14	+
31	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	Isabel		X	21/05/2018	nr	33,15	+
32	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	Niagara Rosada		X	21/05/2018	nr	25,17	+
33	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	BRS Linda	X		22/05/2018	+	20,80	+
34	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	BRS Linda	X		22/05/2018	+	21,31	+
35	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	Isabel Muscat		X	21/05/2018	nr	26,39	+
36	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	Sugraone		X	21/05/2018	nr	19,75	+
37	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	Sugraone		X	21/05/2018	nr	19,29	+
38	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	Crimson		X	21/05/2018	nr	17,51	+
39	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	BRS Magna		X	21/05/2018	nr	18,75	+
40	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	Red Globe	X		22/05/2018	+	17,11	+

ID amostra	Data da coleta	Local	Amostra	Variedade	Amostra com sintoma		Data do processamento	Isolamento	qPCR (Média Ct)	cPCR
					Sim	Não				
41	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	Isabel Muscat		X	21/05/2018	nr	18,36	+
42	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	<i>Amaranthus</i> sp.		X	21/05/2018	nr	24,68	+
43	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	BRS Cora		X	21/05/2018	nr	22,64	+
44	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	BRS Isis		X	21/05/2018	nr	21,04	+
45	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	IAC 572		X	21/05/2018	nr	23,32	+
47	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	BRS Magna		X	21/05/2018	nr	20,23	+
48	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	Red Globe		X	21/05/2018	nr	19,83	+
49	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	<i>Amaranthus</i> sp.		X	21/05/2018	nr	28,41	+
51	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	Niágara Rosada		X	21/05/2018	nr	21,91	+
52	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	BRS Nubia		X	21/05/2018	nr	20,12	+
53	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	Isabel		X	21/05/2018	nr	28,11	+
54	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	Itália		X	21/05/2018	nr	30,83	+
55	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	Thompson Seedless		X	21/05/2018	nr	19,35	+
56	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	Sugraone		X	21/05/2018	nr	21,74	+
57	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	BRS Magna		X	21/05/2018	nr	24,85	+
58	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	BRS Linda		X	21/05/2018	nr	29,47	+
59	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	BRS Isis		X	21/05/2018	nr	28,16	+
60	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	Thompson Seedless		X	21/05/2018	nr	28,94	+

ID amostra	Data da coleta	Local	Amostra	Variedade	Amostra com sintoma		Data do processamento	Isolamento	qPCR (Média Ct)	cPCR
					Sim	Não				
61	21/05/2018	PB <sup>1</sup>	Folha	BRS Cora		X	21/05/2018	nr	24,07	+
63	21/05/2018	PB	Folha	Benitaka		X	21/05/2018	nr	25,88	+
64	21/05/2018	PB	Folha	Brasil		X	21/05/2018	nr	23,13	+
65	21/05/2018	PB	Folha	Brasil		X	21/05/2018	nr	28,97	+
66	21/05/2018	PB	Folha	Niágara Rosada		X	21/05/2018	nr	26,98	+
67	21/05/2018	PB	Folha	BRS Vitoria		X	21/05/2018	nr	25,70	+
68	21/05/2018	PB	Folha	Niágara Rosada		X	21/05/2018	nr	30,49	+
69	21/05/2018	PB	Folha	BRS Magna		X	21/05/2018	nr	23,11	+
70	21/05/2018	PB	Folha	BRS Cora		X	21/05/2018	nr	21,43	+
71	21/05/2018	PB	Folha	Isabel		X	21/05/2018	nr	19,92	+
72	21/05/2018	PB	Folha	IAC 572		X	21/05/2018	nr	21,68	+
73	21/05/2018	PB	Folha	BRS Linda		X	21/05/2018	nr	20,15	+
74	21/05/2018	PB	Folha	BRS Nubia	X		22/05/2018	-	17,79	+
75	21/05/2018	PB	Folha	Crimson	X		22/05/2018	-	18,59	+
76	21/05/2018	PB	Folha	Itália	X		22/05/2018	-	19,20	+
77	21/05/2018	PB	Folha	Thompson Seedless	X		22/05/2018	+	19,45	+
78	21/05/2018	PB	Folha	Sugraone	X		22/05/2018	+	20,94	+
79	21/05/2018	PB	Folha	BRS Linda	X		22/05/2018	-	23,49	+



ID amostra	Data da coleta	Local	Amostra	Variedade	Amostra com sintoma		Data do processamento	Isolamento	qPCR (Média Ct)	cPCR
					Sim	Não				
80	21/05/2018	PB	Folha	BRS Isis	X		22/05/2018	+	18,75	+
81	21/05/2018	PB	Folha	Thompson Seedless	X		22/05/2018	+	22,56	+
82	21/05/2018	PB	Folha	BRS Vitoria	X		22/05/2018	-	19,21	+
83	21/05/2018	PB	Folha	Benitaka	X		22/05/2018	-	20,39	+
84	21/05/2018	PB	Folha	BRS Linda	X		22/05/2018	+	19,78	+
85	21/05/2018	PB	Folha	Niágara Rosada	X		22/05/2018	+	18,87	+
86	21/05/2018	PB	Raiz	Red Globe	X		22/05/2018	nr	25,52	+
87	21/05/2018	PB	Raiz	Red Globe	X		22/05/2018	nr	22,13	+
88	21/05/2018	PB	Raiz	Red Globe	X		22/05/2018	nr	28,17	+
89	21/05/2018	PB	Raiz	Red Globe	X		22/05/2018	nr	31,51	-
90	21/05/2018	PB	Raiz	Red Globe	X		22/05/2018	nr	32,40	-
91	21/05/2018	PB	Raiz	Red Globe	X		22/05/2018	nr	36,22	-
92	21/05/2018	PB	Raiz	Red Globe	X		22/05/2018	nr	34,92	-
93	21/05/2018	PB	Raiz	Red Globe	X		22/05/2018	nr	28,24	+
94	21/05/2018	PB	Raiz	Red Globe	X		22/05/2018	nr	27,21	+
95	21/05/2018	PB	Raiz	Red Globe	X		22/05/2018	nr	35,69	-
96	21/05/2018	PB	Raiz	Red Globe	X		22/05/2018	nr	32,40	-
97	22/05/2018	CV <sup>2</sup>	Folha	40-05 CR	X		22/05/2018	+	27,54	+

ID° amostra	Data da coleta	Local	Amostra	Variedade	Amostra com sintoma		Data do processamento	Isolamento	qPCR (Ct médio)	cPCR
					Sim	Não				
98	22/05/2018	CV	Folha	02-11	X		22/05/2018	+	19,11	+
99	22/05/2018	CV	Folha	05-03	X		22/05/2018	+	23,92	+
100	22/05/2018	CV	Folha	02-05	X		22/05/2018	+	29,03	+
101	22/05/2018	CV	Folha	33-01	X		22/05/2018	+	17,39	+
102	22/05/2018	CV	Folha	14-05 T	X		22/05/2018	+	18,02	+
103	22/05/2018	CV	Folha	20-24	X		22/05/2018	+	21,20	+
104	22/05/2018	CV	Folha	42-16	X		22/05/2018	+	25,94	+
105	22/05/2018	CV	Folha	Red Globe	X		22/05/2018	+	19,70	+
106	22/05/2018	CV	Folha	21-39	X		22/05/2018	+	22,71	+
107	22/05/2018	CV	Folha	42-1010	X		22/05/2018	+	20,85	+
108	22/05/2018	CV	Folha	33-01		X	22/05/2018	nr	21,63	+
109	22/05/2018	CV	Folha	11-01		X	22/05/2018	nr	17,17	+
110	22/05/2018	CV	Folha	02-05		X	22/05/2018	nr	19,60	+
111	22/05/2018	CV	Folha	Porta enxerto 313		X	22/05/2018	nr	Indeterminado	-
112	22/05/2018	CV	Folha	02-05		X	22/05/2018	nr	Indeterminado	-
113	22/05/2018	CV	Folha	28-18		X	22/05/2018	nr	18,62	+
114	22/05/2018	CV	Folha	03-10		X	22/05/2018	nr	19,29	+
115	22/05/2018	CV	Folha	42-21T		X	22/05/2018	nr	18,90	+

ID amostra	Data da coleta	Local	Amostra	Variedade	Amostra com sintoma		Data do processamento	Isolamento	qPCR (Ct médio)	cPCR
					Sim	Não				
116	22/05/2018	CV	Folha	18-33		X	22/05/2018	nr	29,04	+
117	22/05/2018	CV	Folha	68-02		X	22/05/2018	nr	22,86	+
118	22/05/2018	CV	Folha	1505+ 572		X	22/05/2018	nr	19,70	+
119	22/05/2018	CV	Folha	05-07		X	22/05/2018	nr	22,22	+
120	22/05/2018	CV	Folha	21-39		X	22/05/2018	nr	22,47	+
121	22/05/2018	CV	Folha	01-07		X	22/05/2018	nr	22,36	+

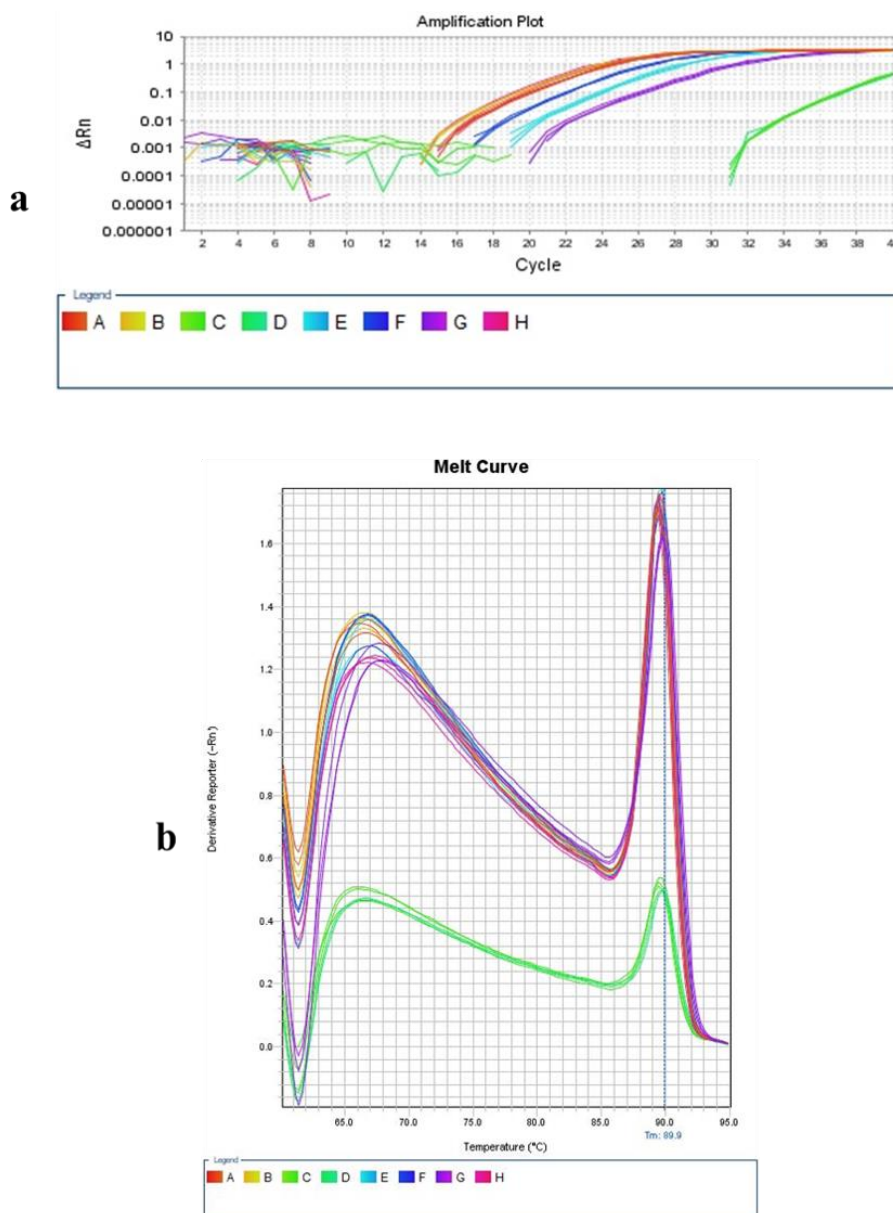
<sup>1</sup> PB, Projeto Bebedouro (Campo Experimental da Embrapa Semiárido).

<sup>2</sup> CV, Casa de vegetação da Embrapa Semiárido.

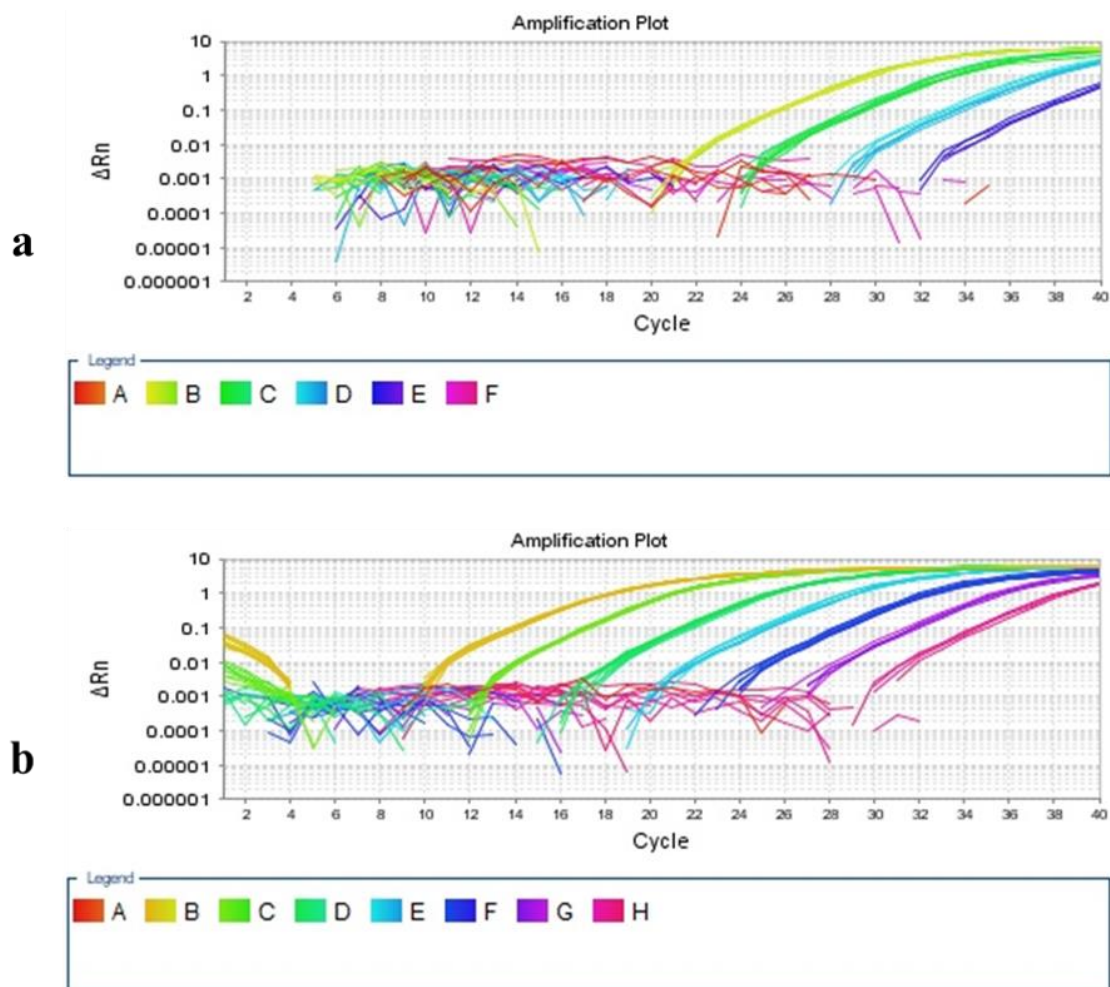
<sup>3</sup> (+) PCR ou isolamento positivo.

<sup>4</sup> (-) PCR ou isolamento negativo.

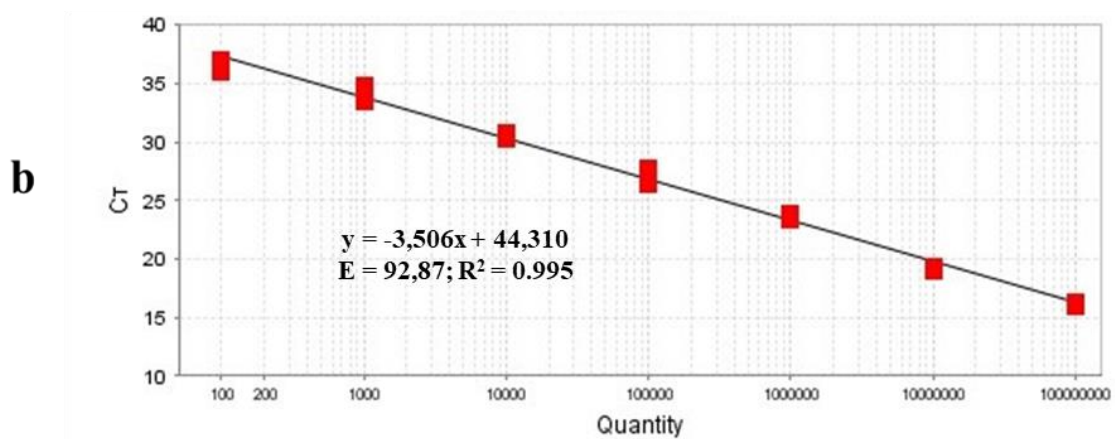
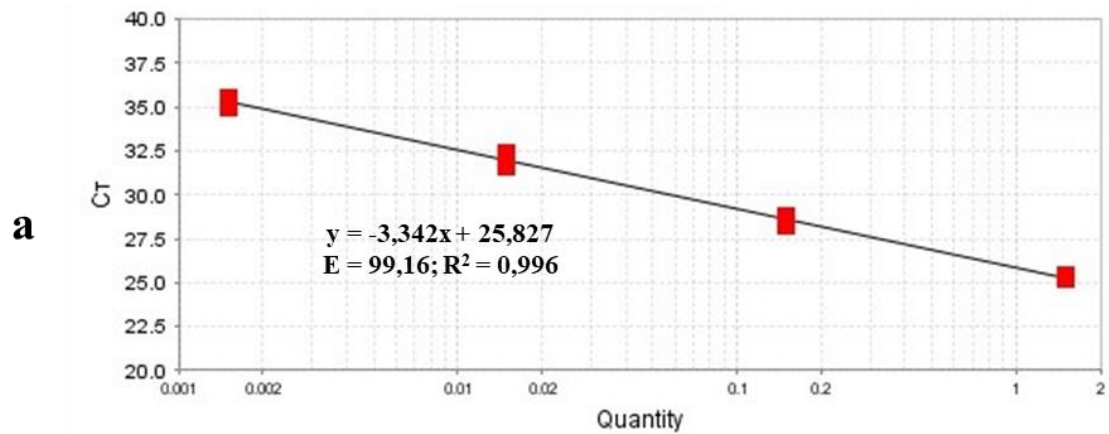
<sup>5</sup> nr, não realizado.



**Figura A1.** PCR em tempo real (SYBR<sup>®</sup> Green) com o par de *primers* Xcv18R/19F, utilizando como molde DNA genômico ( $5 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ ) de diferentes espécies de *Xanthomonas*. (a) Curvas de amplificação. (b) Curvas de *melting*. Legenda: A - *X. citri* pv. *viticola* (UnB 1188); B - *X. citri* pv. *viticola* (NCPBP 2475); C - *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (UnB 1395); D - *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (UnB 187). E - *X. axonopodis* pv. *ricini* (UnB 607); F - *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* (UnB 764); G - *X. citri* pv. *fuscans* (UnB 773); H - *X. citri* pv. *citri* (UnB 92). Curvas geradas pelo programa Step One v2.3 (Applied Biosystems).



**Figura A2.** Curvas de amplificação da PCR em tempo real (SYBR<sup>®</sup> Green) com o par de *primers* Xcv18F/19R, para detecção de (a) DNA genômico ( $1,5 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  a  $150 \text{ fg } \mu\text{l}^{-1}$ ) e (b) suspensão bacteriana ( $10^8$  a  $1 \text{ UFC ml}^{-1}$ ) de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (UnB 1188). Legenda (a): A - Controle Negativo (água destilada esterilizada); B -  $1,5 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ ; C -  $150 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$ ; D -  $15 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$ ; E:  $1,5 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$ ; F:  $150 \text{ fg } \mu\text{l}^{-1}$ . Legenda (b): Controle Negativo (água destilada esterilizada); B -  $10^8 \text{ UFC ml}^{-1}$ ; C -  $10^7 \text{ UFC ml}^{-1}$ ; D -  $10^6 \text{ UFC ml}^{-1}$ ; E -  $10^5 \text{ UFC ml}^{-1}$ ; F -  $10^4 \text{ UFC ml}^{-1}$ ; G -  $10^3 \text{ UFC ml}^{-1}$ ; H  $10^2 \text{ UFC ml}^{-1}$ . Curvas geradas pelo programa Step One v2.3 (Applied Biosystems).



**Figura A3.** Curvas padrão gerada por PCR em tempo real (SYBR<sup>®</sup> Green) com o par de primers Xcv18F/19R, para detecção de (a) DNA genômico (1,5 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  a 150 fg  $\mu\text{l}^{-1}$ ) e (b) suspensão bacteriana ( $10^8$  a 1 UFC  $\text{ml}^{-1}$ ) de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (UnB 1188). Curvas geradas pelo programa Step One v2.3 (Applied Biosystems).

# CAPÍTULO 3

---

**Interação entre *Xanthomonas citri* pv. *viticola* e a hospedeira alternativa natural, *Senna obtusifolia*, e espécies da família Amaranthaceae**

## **Interação entre *Xanthomonas citri* pv. *viticola* e a hospedeira alternativa natural, *Senna obtusifolia*, e espécies da família Amaranthaceae**

### **Resumo**

Hospedeiras alternativas desempenham papel importante na sobrevivência de bactérias fitopatogênicas, além de serem fontes de inóculo para novas infecções. A identificação de potenciais hospedeiras alternativas e os estudos de interação planta-patógeno são demandas para elaboração de estratégias de manejo de doenças. Neste trabalho objetivou-se elucidar aspectos da interação entre *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Xcv), agente causal do cancro bacteriano da videira, e a hospedeira alternativa natural, *Senna obtusifolia*, assim como espécies da família Amaranthaceae (*Amaranthus cruentus*, *A. spinosus*, *Chenopodium giganteum* e *C. quinoa*), visando fornecer subsídios para melhor entendimento da epidemiologia do cancro bacteriano da videira. Como resultado de testes patogenicidade, plantas das cinco espécies avaliadas apresentaram sintomas após inoculação de Xcv. A dinâmica da população de Xcv foi avaliada de 0 a 20 dias após a inoculação (DAI). Nas plantas de todas as espécies avaliadas observou-se um aumento da população total do patógeno após inoculação. Xcv também apresentou capacidade de sobreviver epifiticamente em altas populações em folhas de *S. obtusifolia*, até a última avaliação, aos 20 DAI. A capacidade de translocação vascular do patógeno foi avaliada por inoculação em caule e posterior detecção por BIO-PCR. Em plantas de *S. obtusifolia*, a translocação acropetal e basipetal foi verificada em segmentos de caule coletados a distâncias de 1, 5, 10 e 15 cm do ponto de inoculação (PI) aos 14 e 21 DAI. Em espécies da família Amaranthaceae, avaliou-se apenas a translocação acropetal em segmentos de caule coletados à 5 cm acima do PI aos 21 DAI. Xcv foi capaz de se translocar em *S. obtusifolia* em ambos os sentidos, sendo detectada a 15 e 10 cm acima e abaixo do PI, respectivamente. Em plantas da família Amaranthaceae o patógeno foi detectado em todas as amostras testadas. Os resultados obtidos indicaram que Xcv é capaz de colonizar sistemicamente plantas das cinco espécies avaliadas neste estudo.

**Palavras-chave:** cancro bacteriano da videira, BIO-PCR, dinâmica populacional, *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, *Vitis vinifera*



## **Interaction between *Xanthomonas citri* pv. *viticola* and its alternative natural host, *Senna obtusifolia* and species of the family Amaranthaceae**

### **Abstract**

Alternative hosts play an important role on the survival of plant pathogenic bacteria. They represent sources of inoculum for new infection, therefore the identification of potential alternative hosts and the study of their interaction with plant pathogens are essential for the development of effective disease management strategies. The objective of this study was to elucidate aspects of the interaction between *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Xcv), the grapevine bacterial canker pathogen, and its alternative natural host, *Senna obtusifolia*, and species of the family Amaranthaceae (*Amaranthus cruentus*, *A. spinosus*, *Chenopodium giganteum* and *C. quinoa*), to provide subsidies for a better understanding of the epidemiology of grapevine bacterial canker. Pathogenicity tests showed that all species evaluated presented symptoms after inoculation of Xcv. The dynamics of the leaf population was evaluated from 0 to 20 days after inoculation (DAI). In all plant species, it was observed an increase of the total population of the pathogen after inoculation. Xcv also showed the ability to survive epiphytically in high populations in *S. obtusifolia* leaves, until the last evaluation at 20 DAI. The ability to invade plant tissues systemically was evaluated by stem inoculation and subsequent detection by BIO-PCR. For *S. obtusifolia* acropetal and basipetal translocation was evaluated by collecting stem segments at 1, 5, 10 and 15 cm from the inoculation point (IP) at 14 and 20 DAI. In Amaranthaceae plants only the acropetal translocation was evaluated at 5 cm from IP at 21 DAI. Xcv was able to translocate in *S. obtusifolia* in both directions, being detected at 15 and 10 cm above and below the IP, respectively. In plants of the family Amaranthaceae the pathogen was detected in all samples evaluated. The results indicated that Xcv is able to colonize systemically all plant species used in the study.

**Keywords:** grapevine bacterial canker, BIO-PCR, population dynamics, *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, *Vitis vinifera*

## 1. Introdução

O cancro bacteriano da videira, causado por *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Xcv), é a doença bacteriana de maior importância em parreirais no Submédio do Vale do São Francisco, com alta incidência e responsável por quedas expressivas na produtividade (Gama et al., 2018). Devido à sua ocorrência restrita e ao potencial de risco para o desenvolvimento da viticultura nacional, a bactéria é regulamentada como uma Praga Quarentenária Presente (PQP) (MAPA, 2018).

Na ausência de condições ideais para infecção, Xcv pode sobreviver de forma epifítica ou em cancos formados nos órgãos de parte aérea da videira (Araújo, 2001). De acordo com Silva et al. (2012), Xcv também é capaz de sobreviver, por até 80 dias, em tecidos de videira infectados na superfície do solo. Tostes et al. (2014) relataram a presença de Xcv associada à superfície do tegumento e no interior de sementes de uva coletadas de videiras cultivadas em áreas de ocorrência do cancro bacteriano, sugerindo sua importância na sobrevivência e disseminação do patógeno.

Plantas hospedeiras alternativas possuem um papel importante na sobrevivência e perpetuação de bactérias fitopatogênicas, além de serem fontes de inóculo para novas infecções (Fernandez-Sanz et al., 2016; Gonçalves et al., 2017; Osdaghi et al., 2016; Ocimati et al., 2018). Peixoto et al. (2007) relataram a ocorrência de infecção natural de Xcv plantas invasoras de *Alternanthera tenella*, *Amaranthus* sp., *Glycine* sp. e *Senna obtusifolia*, coletadas em parreirais no Submédio do Vale do São Francisco. Na Índia, infecção natural também foi relatada em plantas de *Azadirachta indica* (neem) e *Phyllanthus maderaspatensis* (Nayudu, 1972). Por meio de inoculações artificiais, Xcv foi capaz de infectar e causar sintomas em plantas da família Anacardiaceae, como *Mangifera indica*, *Anacardium occidentale*, *Spondias tuberosa*, *S. dulcis*, e *Schinus terebenthifolius* (Araújo & Robbs, 2000), além de outras plantas pertencentes a diferentes famílias botânicas, como *Pilea* sp. (Urticaceae), *Chamaesyce hirta* (Euphorbiaceae),

*Eragrostis pilosa*, *Dactyloctenium aegyptium* (Poaceae) (Peixoto et al., 2007), *Glycine* sp., *S. obtusifolia*, *Desmodium discolor*, *Vigna unguiculata* (Fabaceae), *A. deflexus* (Amaranthaceae), *A. indica* (Meliaceae) e *Solanum lycopersicum* (Solanaceae) (Santos et al., 2014), sugerindo o papel dessas espécies como hospedeiras alternativas da bactéria.

Devido ao fato de Xcv ser um patógeno quarentenário, restrito a algumas regiões do país, ainda existem poucos estudos sobre medidas de controle do cancro bacteriano da videira em condições brasileiras. No Submédio do Vale do São Francisco as principais medidas utilizadas de controle são: evitar podas de produção no período chuvoso, época em que o clima é favorável à infecção e disseminação do patógeno, estabelecimento de quebra ventos, desinfestação de implementos, equipamentos e materiais de poda e colheita, queima ou compostagem de restos de poda e material com sintomas, inspeções periódicas nos parreirais e eliminação de plantas severamente atacadas e possíveis hospedeiros alternativos do patógeno (Nascimento & Mariano, 2004; Peixoto et al., 2007; Silva et al., 2014; Barbosa et al., 2016).

O objetivo deste trabalho foi elucidar aspectos importantes da interação entre Xcv e a hospedeira alternativa natural, *Senna obtusifolia*, e espécies da família Amaranthaceae, visando fornecer subsídios para melhor entendimento da epidemiologia e manejo do cancro bacteriano da videira.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Isolados, meios de cultura e transformação

Os isolados de *Xcv* utilizados no estudo estão listados na Tabela 1. Foram utilizados seis isolados, quatro selvagens e dois mutantes resistentes a canamicina. Os isolados A3 e UnB 1188 foram utilizados para obtenção dos mutantes. Todos os isolados foram preservados em água destilada esterilizada à temperatura ambiente e em glicerol 30% a -20 °C e cultivados em meio de cultura NYDA (Peixoto et al., 2006) ou NYG (Daniels et al., 1984) a 28°C, de acordo com o objetivo. Os antibióticos ampicilina e canamicina, nas concentrações de 100 e 10 µg ml<sup>-1</sup>, respectivamente, foram utilizados quando necessário.

Para obtenção dos mutantes, os isolados foram transformados por eletroporação utilizando a metodologia descrita por Amaral et al., (2005), utilizando o plasmídeo integrativo pPM7g (Martins et al., 2010), o qual contém o gene da proteína fluorescente (*gfp*) e de resistência a canamicina (*aph*) como fator de seleção. O vetor de expressão pPM7g tem como característica a integração do sistema de expressão no *locus amy* da bactéria, ocasionando o *knockout* do gene de  $\alpha$ -amilase. Após eletroporação, as células foram ressuspensas em 1 ml de meio NYG líquido sem antibiótico e mantidas sob agitação (150 rpm) a 28° C por 4h. Após esse período, 200 µl foram plaqueados em meio sólido contendo 10 µg ml<sup>-1</sup> de canamicina, até aparecimento das primeiras colônias. Após o aparecimento das colônias, estas foram repicadas e preservadas, conforme descrito anteriormente.

Para confirmar a integração do vetor de expressão pPM7g nos genomas dos isolados de *Xcv* transformados, foi realizada PCR com o par de *primers* Kan-F (5'-GATGGATTGCACGCAGGTTC-3') e Kan-R (5'-AAAAGCGGCCATTTTCCACC-3'), desenhados para amplificar uma sequência de 598 pb do gene que confere resistência a canamicina. A PCR foi realizada em termociclador (My Cyciler, Bio-Rad) de acordo com o seguinte programa: um ciclo de 95°C por 2 min para desnaturação inicial, seguido de 30 ciclos

de 95°C por 30 s para desnaturação, 64°C por 30 s para anelamento e 72°C por 40 s para extensão. Por fim, um ciclo de 72°C por 10 min para extensão final. As reações continham: 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM de cada *primer*, 1X tampão de PCR (20 mM de Tris HCl pH 8,4; 50 mM KCl), 0,4 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), 2 µl de DNA (10 ng µl<sup>-1</sup>), e água destilada esterilizada para um volume final de 12 µl. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5 % em tampão 0,5X TBE [Tris 50 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM e ácido bórico 50 mM (pH 8,30)], corados com brometo de etídio (0,5 µg ml<sup>-1</sup>) e registrados em fotodocumentador L-PIX ST (Loccus Biotecnologia). A confirmação também foi realizada pelo cultivo dos clones em meio de cultura NYG contendo amido solúvel (0,2%). Em mutantes de *Xcv* carregando o sistema de expressão integrado ao genoma, mediante a perda da capacidade de degradação de amido, espera-se que não ocorra a formação de halos ao redor do crescimento da colônia (Martins et al., 2010). A verificação foi conduzida, colocando-se solução de iodo lugol em contato com o meio de cultura.

A estabilidade de integração do vetor no genoma dos transformantes, foi avaliada pela capacidade de crescimento da bactéria em meio de cultura com canamicina, após sucessivas repicagens, e confirmação da presença do gene de resistência ao antibiótico por PCR.

O padrão de crescimento dos isolados mutantes em relação aos selvagens foi realizado por meio da análise de curvas de crescimento. Para construção das curvas de crescimento, culturas dos isolados foram multiplicadas em tubos Falcon contendo 10 ml de meio NYD e mantidas a 28 °C, a 200 rpm por 24 horas, tendo como ponto de partida uma colônia por isolado. Após este período, as culturas foram diluídas (1:10) em Erlenmeyer contendo 50 ml de meio NYD e mantidas sob as mesmas condições de crescimento citadas anteriormente. Ao longo das 24 horas seguintes alíquotas das culturas foram retiradas a cada duas horas, para leitura de O.D. 600 nm em espectrofotômetro digital UV- 1203 (Shimadzu Corporation, Japão).

## 2.2. Patogenicidade e dinâmica populacional de isolados Xcv em videira

Ensaio de patogenicidade e dinâmica da população *in planta* foram realizados com o intuito de verificar se a integração do vetor de expressão em *amy* não afeta a capacidade dos isolados mutantes de Xcv em infectar videira (*Vitis vinifera*). Foram utilizadas nos ensaios plantas da variedade Thompson Seedless, mantidas casa de vegetação. As inoculações foram realizadas com suspensões bacterianas dos isolados selvagens (A3 e UnB 1188) e mutantes (A3<sup>kan</sup> e UnB 1188<sup>kan</sup>). Após o preparo, 100 µl de cada suspensão bacteriana foram infiltrados com auxílio de seringa hipodérmica sem agulha na superfície abaxial do limbo foliar. Os testes de patogenicidade consistiram em avaliar a capacidade dos isolados em produzir sintomas e o reisolamento do patógeno, aos 12 dias após a inoculação, em meio NYDA acrescido de ampicilina (NYDAM). A dinâmica populacional dos isolados de Xcv em videira foi avaliada de 0 a 20 dias após a inoculação, com intervalo de quatro dias entre as avaliações. Para quantificar a população, quatro fragmentos (1 cm<sup>2</sup>) por repetição foram recortados a partir do ponto de inoculação e esmagados em cadinho contendo 4 ml de água destilada esterilizada. Em seguida cada amostra foi diluída em série (1:10) até 10<sup>-4</sup> e 100 µl de cada diluição foram plaqueados em meio NYDAM. As placas foram incubadas a 28 °C por 48-72 horas. A avaliação consistiu na contagem de colônias típicas de Xcv em meio de cultura para determinação da população do patógeno expressa em UFC por cm<sup>2</sup> de limbo foliar. O delineamento experimental utilizado nos ensaios de patogenicidade e de dinâmica populacional foi inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento (isolados de Xcv), sendo cada repetição constituída por uma folha com quatro pontos de inoculação por folha.

### **2.3. Patogenicidade de Xcv em *Senna obtusifolia* e espécies da família Amaranthaceae**

A patogenicidade de Xcv foi testada em duas espécies de plantas invasoras [*Senna obtusifolia* (fedegoso) e *Amaranthus spinosus* (caruru)], e em três espécies de plantas cultivadas [*A. cruentus* var. BRS Alegria (amaranto), *Chenopodium giganteum* (amaranticolor) e *C. quinoa* var. BRS Syetetuba (quinoa)]. Com a exceção de *S. obtusifolia*, as demais espécies pertencem a família Amaranthaceae. Foram utilizadas plantas com 30 dias após a germinação das sementes. O isolado P7 de Xcv foi utilizado nas inoculações devido sua alta virulência em videira (dados não mostrados). O método de inoculação utilizado foi o de fricção com gaze. Compressas de gaze dupla umedecidas com suspensão bacteriana foram levemente friccionadas em ambas as superfícies da folha, conforme descrito por Nascimento et al., (2006). As plantas foram avaliadas diariamente durante 12 dias, observando-se a ocorrência e evolução de sintomas. Decorrido esse período, amostras de folhas foram coletadas e submetidas ao isolamento em meio NYDAM. Colônias com aspecto semelhante à Xcv foram selecionadas, culturas puras foram estabelecidas e submetidas à PCR com par de *primers* específicos (Xpig2F/1R) para confirmação da identidade do patógeno, conforme descrito por Villela et al. (2019). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 5 tratamentos (espécies de plantas) e 15 repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por um vaso com uma planta cada e seis folhas inoculadas por planta.

### **2.4. Interação entre Xcv e *Senna obtusifolia***

#### *2.4.1. Dinâmica populacional*

Ensaio foram realizados para avaliar a dinâmica da população epifítica e total de Xcv em folhas de *S. obtusifolia*, após inoculação. Foram utilizadas plantas com 60 dias após a germinação das sementes. As inoculações foram realizadas com suspensões bacterianas dos isolados A3<sup>kan</sup> e P7. Foram utilizados dois métodos de inoculação: pulverização de suspensão

bacteriana com auxílio de borrifadores manuais, até o ponto de escorrimento e o de fricção com gaze para determinar para determinar a dinâmica da população epifítica e total, respectivamente. As avaliações ocorreram de 0 a 20 dias, com intervalo de quatro dias entre as avaliações. As amostras foram constituídas por 1 g de folhas, coletadas do terço superior, médio e inferior da planta. O isolamento da população epifítica foi realizado por meio de lavagem dos folíolos em frascos tipo Erlenmeyer contendo 20 ml de solução esterilizada de sulfato de magnésio (10 mM) contendo Tween 20 (0,05%), sob agitação a 200 rpm por uma hora. Para o isolamento da população total, as amostras foram totalmente esmagadas em cadinho contendo 20 ml da mesma solução utilizada no isolamento epifítico. Em seguida, cada amostra foi diluída em série ( $10^0$  a  $10^{-4}$ ) e 100  $\mu$ l de cada diluição foram plaqueados em meio de cultura. Nos isolamentos de Xcv em amostras provenientes de plantas inoculadas com os isolados mutante e selvagem, foi utilizado placas contendo meio de cultura NYDAM com e sem acréscimo de canamicina, respectivamente. As placas foram incubadas a 28 °C por 48-72 horas. As avaliações consistiram na contagem de colônias típicas de Xcv em meio de cultura, para determinação da população expressa em UFC por grama de folha e na detecção do patógeno por BIO-PCR, para confirmação da presença do patógeno. Para a detecção de Xcv, as placas foram lavadas com 1 ml de água destilada esterilizada e as suspensões concentradas obtidas diluídas na proporção 1:100. Destas diluições, foram retiradas alíquotas de 2  $\mu$ l para análise em PCR convencional com *primers* específicos (Xpig2F/1R), conforme protocolo descrito por Villela et al. (2019). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento (isolados de Xcv) e para cada tempo de avaliação, sendo cada repetição constituída por quatro vasos com uma planta cada e seis folhas inoculadas por planta.



#### 2.4.2. *Progresso da severidade de sintomas*

Para avaliar o progresso da severidade de sintomas em *S. obtusifolia*, plantas com 30 dias após a germinação das sementes, foram inoculadas por meio de infiltração de 40 µl de suspensão bacteriana na superfície abaxial dos folíolos com auxílio de seringa hipodérmica sem agulha. Foram inoculados quatro folíolos por planta. Os isolados de Xcv utilizados no preparo das suspensões bacterianas estão descritos no item 2.4.1. As plantas foram visualmente inspecionadas aos 4, 8, 12, 16 e 20 dias após a inoculação, avaliando-se a severidade dos sintomas. A severidade dos sintomas foi avaliada por meio da elaboração de uma escala de notas que varia de 0 a 4, onde: 0 = sem sintoma; 1 = lesão encharcada; 2 = lesão encharcada com pontos necróticos; 3 = lesão necrótica; 4 = queda do folíolo (Figura 1). O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com quatro repetições por tratamento (isolados de Xcv). Cada parcela foi constituída por cinco vasos com duas plantas cada.

#### 2.4.3. *Translocação vascular*

Foram realizados ensaios para monitorar a translocação ascendente e descendente de Xcv em caule de *S. obtusifolia*. Para tanto, foram utilizadas plantas com 60 dias após a germinação das sementes. Os isolados de Xcv utilizados no preparo das suspensões bacterianas estão descritos no item 2.4.1. As plantas foram inoculadas por meio de um corte longitudinal de 0,5 cm de comprimento a 15 cm da base do caule, onde posteriormente foram infiltrados 10 µl de suspensão bacteriana com auxílio de uma micropipeta. Após as inoculações, as lesões foram cobertas com algodão umedecido em água destilada esterilizada, envolvendo-se a haste com papel alumínio, com o intuito de evitar ressecamento. Aos 14 e 21 dias após a inoculação, segmentos de 1 cm do caule foram seccionados a diferentes distâncias (0, 1, 5, 10 e 15 cm) acima e abaixo do ponto de inoculação. Cada segmento foi pesado e esmagado em cadinho contendo 1 ml de solução esterilizada de sulfato de magnésio (10 mM) contendo Tween 20

(0,05%). Em seguida, as etapas para determinação da população e detecção de Xcv em cada segmento de caule foram realizadas conforme descrito no item 2.4.1. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento (isolados de Xcv) e para cada tempo de avaliação, sendo cada repetição constituída por quatro vasos com uma planta cada.

## **2.5. Interação entre Xcv e espécies da família Amaranthaceae**

### *2.5.1. Dinâmica populacional*

Ensaio foram realizados para avaliar a dinâmica da população total de Xcv em espécies da família Amaranthaceae, após a inoculação. Foram utilizadas plantas de *A. spinosus*, *A. cruentus* var. BRS Alegria, *C. giganteum* e *C. quinoa* var. BRS Syetetuba com 30 dias após a germinação das sementes. As plantas foram inoculadas pelo método de fricção com gaze com suspensão bacteriana do isolado AM1. As avaliações foram realizadas de 0 a 20 dias após a inoculação, com intervalo de quatro dias entre as avaliações. As amostras foram constituídas de três folhas, coletadas do terço superior, médio e inferior da planta. Após a coleta, as amostras foram processadas e analisadas conforme o item 2.4.1. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento (espécies de Amaranthaceae) e para cada tempo de avaliação, sendo cada repetição constituída por quatro vasos com uma planta cada e seis folhas inoculadas por planta.

### *2.5.2. Progresso da incidência de sintomas e translocação vascular*

Foram realizados ensaios para avaliar o progresso da incidência de sintomas expressos e a translocação vascular de Xcv em plantas da família Amaranthaceae, após a inoculação do patógeno. As espécies de plantas e o isolado de Xcv utilizados nos ensaios foram os mesmos descritos no item 2.5.1. Para a avaliação do progresso da incidência de sintomas, as plantas

foram inoculadas empregando-se a mesma metodologia descrita no item 2.3. As plantas foram visualmente inspecionadas aos 4, 8, 12, 16 e 20 dias após a inoculação, avaliando o número de folhas com sintomas de clorose e necrose. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento (espécies de Amaranthaceae), sendo cada repetição constituída por três vasos com uma planta cada e seis folhas avaliadas por planta.

A translocação vascular de Xcv foi avaliada a partir da inoculação do patógeno no caule das plantas. As plantas foram inoculadas por meio de um corte longitudinal de 0,5 cm de comprimento a 10 cm da base do caule, onde, em seguida, foram infiltrados 10 µl de suspensão bacteriana com auxílio de uma micropipeta. Para evitar ressecamento, as lesões foram cobertas com algodão umedecido em água destilada esterilizada, envolvendo-se o caule com papel alumínio. Aos 21 dias após a inoculação, segmentos de 1 cm do caule foram seccionados a 5 cm acima do ponto de inoculação. Os segmentos foram processados e analisados conforme descrito no item 2.4.3. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento (espécies de Amaranthaceae), sendo cada repetição constituída por um vaso com uma planta.

Todos os ensaios (itens 2.2 a 2.5) foram conduzidos em casa de vegetação, sob temperatura de  $27 \pm 3$  °C e umidade relativa em torno de 75%. Plantas de *S. obtusifolia* e da família Amaranthaceae utilizadas nos ensaios foram semeadas e cultivadas em vasos com capacidade de um litro contendo solo esterilizado em autoclave. Irrigações foram realizadas conforme a necessidade hídrica das plantas. Após a inoculação de Xcv, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 48 horas. As suspensões bacterianas utilizadas nas inoculações foram preparadas em solução esterilizada de sulfato de magnésio (10 mM) contendo Tween 20 (0,05%), a partir de culturas puras dos isolados de Xcv (Tabela 1), cultivados em meio NYDA por 48 horas. As concentrações das suspensões foram ajustadas com auxílio de espectrofotômetro (Shimadzu Corporation, Japão) para leituras de O.D. 550 nm e absorbância

de 0,575 ( $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>). Como controle negativo dos ensaios, as plantas foram inoculadas com a mesma solução utilizada no preparo das suspensões bacterianas, porém, sem a presença do patógeno. Todos os ensaios foram repetidos uma vez.

Todos os materiais biológicos (DNA, culturas, suspensões de células), e plásticos, utilizados durante os ensaios foram submetidos à esterilização em autoclave antes do descarte. Plantas inoculadas foram incineradas e o solo foi autoclavado antes do descarte.

## **2.6. Análises Estatísticas**

Os dados amostrados foram submetidos à análise de variância com a realização do teste F, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ou submetidas a análise de regressão polinomial a 5% e 1% de probabilidade (Banzatto & Kronka, 2006). As análises foram realizadas, utilizando o programa Sisvar, versão 5.3 (Ferreira, 2008).

## **3. Resultados**

### **3.1. Transformação, patogenicidade e dinâmica populacional de isolados de Xcv em videira**

Nesse estudo buscou-se obter um isolado virulento de Xcv expressando a proteína verde fluorescente (GFP) para realização de estudos de colonização e sobrevivência da bactéria em hospedeiras alternativas. Utilizando a metodologia proposta por Amaral et al. (2005), foi possível obter dois isolados mutantes, A3<sup>kan</sup> e UnB 1188<sup>kan</sup>. Em todas as tentativas de transformação, foram obtidas colônias resistentes a canamicina, porém, com baixíssima expressão da GFP. Para confirmação da integração do vetor ao genoma dos isolados transformados, foi realizada PCR com *primers* desenhados para amplificação de uma região do gene que confere resistência à canamicina. Nas reações tendo como molde o DNA genômico purificado dos isolados transformados, foi observada a amplificação de um segmento de

aproximadamente 598 pb, indicando a inserção do vetor de expressão ao genoma da bactéria (Figura 2). Para confirmar a integração do vetor no *locus amy* de Xcv, foram realizados testes de hidrólise de amido. Conforme o esperado, os isolados mutantes foram incapazes de degradar amido (Figura 3). Após sucessivas repicagens ( $\cong 10$ ) dos isolados transformados, foi observado que os mesmos continuaram resistentes a canamicina, ou seja, foram capazes de crescer meio contendo o antibiótico (Figura 4), indicando que a integração do vetor ao genoma da bactéria é estável. Com intuito de verificar se a integração do vetor de expressão em *amy* não alteraria a capacidade de crescimento de Xcv, foram realizados ensaios para comparar as curvas de crescimento dos isolados selvagens e mutantes em meio de cultura líquido (NYD). Como resultado, observou-se que o crescimento dos isolados mutantes não diferiu em relação aos selvagens (Figura 5).

A patogenicidade e a dinâmica populacional em videira também foram comparadas entre os isolados mutantes e selvagens. Doze dias após a inoculação, foram observados sintomas de clorose, encharcamento e/ou necrose em todos os pontos inoculados, ou seja, os isolados mutantes não mostraram diminuição na habilidade de produzir sintomas de doença em videira quando comparados aos isolados selvagens. O reisolamento foi positivo em todas as repetições. foi observado um aumento da população dos isolados até os 16 dias,

Em relação à dinâmica populacional em videira, foi observado aumento da população do patógeno até os 16 dias após a inoculação. Dentro de cada tempo avaliado, a população dos isolados mutantes e selvagens não diferiram estatisticamente entre si.

### **3.2. Ensaio de patogenicidade de Xcv em *Senna obtusifolia* e espécies da família Amaranthaceae**

Doze dias após a inoculação de Xcv nas plantas das cinco espécies testadas, verificou-se que todas as plantas apresentaram algum tipo de sintoma, exceto nos controles negativos dos ensaios. Em plantas de *S. obtusifolia* foram observados sintomas de clorose, necrose e cancos na superfície adaxial e abaxial dos folíolos (Figura 7). Nas folhas de *A. cruentus* e *A. spinosus* verificou-se sintomas de clorose e necrose em regiões próximas as nervuras. Em plantas de *C. quinoa* e *C. giganteum* sintomas de clorose e necrose com aspecto cor de palha foram visualizados em diferentes pontos do limbo foliar (Figura 8). Colônias típicas de Xcv foram obtidas a partir do isolamento de todas as amostras analisadas. A identidade do patógeno foi confirmada em todas amostras por PCR com *primers* específicos.

### **3.3. Interação entre Xcv e *Senna obtusifolia***

#### *3.3.1. Dinâmica da população epifítica e total*

A dinâmica da população epifítica e total de Xcv em *S. obtusifolia* foi avaliada de 0 a 20 dias após a inoculação. A população epifítica nesse período variou de  $10^5$  UFC  $g^{-1}$  a  $10^7$  UFC  $g^{-1}$ . Foi observado crescimento dessa população no intervalo de 4 a 12 dias. Após esse período, a população manteve-se estável até a última avaliação. Não foram observadas diferenças significativas entre os isolados (A3<sup>kan</sup> e P7) inoculados (Figura 9). A população total variou de  $10^6$  UFC  $g^{-1}$  a  $10^8$  UFC  $g^{-1}$ . Após a inoculação, verificou-se aumento da população até os 16 dias, permanecendo estável até a última avaliação (Figura 10). Não foram observadas colônias típicas de Xcv em amostras de plantas representando os controles negativos dos ensaios. Após contagem do número de colônias, a presença da bactéria foi confirmada por BIO-PCR em todas as amostras.

### 3.3.2. *Progresso da severidade dos sintomas*

Por meio de análise de variância, verificou-se efeito significativo a 1%, para os dois fatores analisados, isolados de Xcv e tempos de avaliação (dias após a inoculação), sobre a severidade dos sintomas induzidos pelo patógeno. Com relação a interação entre os fatores, não foi verificada interação significativa. Em relação aos isolados testados, o selvagem (P7) foi mais agressivo, pois a severidade dos sintomas causados por esse isolado (2,63) foi estatisticamente superior, em relação ao mutante A3<sup>kan</sup> (2,41). A análise de regressão mostrou que o modelo de regressão quadrática a 1% de probabilidade, ajustou-se significativamente à variação da severidade dos sintomas em função do tempo, explicando 98,95% da variação total. De acordo com a equação obtida pela análise de regressão e representada pelo gráfico na Figura 11, a severidade dos sintomas induzidos por Xcv em *S. obtusifolia*, progride com o tempo, resultando em uma severidade máxima de 3,24, aos 20 dias após a inoculação.

### 3.3.3. *Translocação vascular*

A capacidade de translocação vascular de Xcv em *S. obtusifolia* foi avaliada determinado a população, por meio de diluição seriada das amostras e plaqueamento em meio de cultura semisseletivo (NYDAM), e pela detecção do patógeno pelo método de BIO-PCR, em pontos acima e abaixo do ponto de inoculação. Xcv foi capaz de se translocar em ambos sentidos, acropetal e basipetal. Nas plantas inoculadas com Xcv, foi observado no ponto de inoculação a formação de cancro (Figura 12), sintoma semelhante ao que se desenvolve em videiras infectadas pela bactéria. Aos 14 dias após inoculação, a translocação basipetal não diferiu entre os isolados, a bactéria foi detectada até 5 cm. No entanto, a população do isolado selvagem nos pontos coletados à 1 e 5 cm abaixo do ponto de inoculação foi estatisticamente superior em relação ao mutante. No sentido acropetal, a translocação do isolado selvagem foi de 10 cm, enquanto a do mutante foi 5 cm. A população do isolado selvagem 5 cm acima do

ponto de inoculação foi estatisticamente superior em relação ao mutante. Aos 21 dias após a inoculação, a translocação basipetal foi de 10 cm. Porém, a população do isolado selvagem nesse ponto foi estatisticamente superior em relação ao mutante. Como observado na avaliação anterior, a translocação no sentido acropetal foi maior, o patógeno selvagem foi detectado até 15 cm enquanto o mutante até 10 cm. A população do isolado selvagem 10 cm acima do ponto de inoculação também foi estatisticamente superior, em relação ao mutante (Figuras 13 e 14).

### **3.4. Interação entre Xcv e espécies da família Amaranthaceae**

#### *3.4.1. Dinâmica populacional total*

A população total de Xcv (isolado AM1) em quatro espécies de plantas da família Amaranthaceae foi avaliada de 0 a 20 dias após a inoculação. A bactéria foi detectada em todas as espécies e tempos avaliados. Foi observado em todas espécies o aumento da população bacteriana até 16 dias após a inoculação, exceto em *A. cruentus*, onde a população manteve-se constante entre os intervalos de 0 a 4 e de 12 a 16 dias após a inoculação. A população de Xcv nas espécies testadas de Amaranthaceae variou entre  $10^5$  e  $10^8$  UFC  $g^{-1}$ , sendo que a maior população observada, foi em plantas de *C. giganteum* aos 16 e 20 dias após a inoculação (Figura 15).

#### *3.4.2. Progresso da incidência de sintomas e translocação vascular*

Por meio de análise de variância, verificou-se efeito significativo a 1% de probabilidade, apenas para o fator tempo de avaliação (dias após a inoculação), sobre a incidência de sintomas induzidos por Xcv em espécies de plantas da família Amaranthaceae. A espécie de planta e a interação entre os fatores não tiveram efeito significativo sobre a incidência de sintomas. A análise de regressão mostrou que o modelo quadrático a 1% de probabilidade ajustou-se significativamente a variação da incidência de sintomas em função do tempo, explicando



99,49% da variação total dos dados. De acordo com a equação obtida pela análise de regressão e representada pelo gráfico na Figura 16, a incidência de sintomas induzidos por Xcv, progride com o tempo, resultando em incidência máxima de 69,49%, aos 20 dias após a inoculação.

A translocação vascular de Xcv em espécies da família Amaranthaceae, foi avaliada no sentido acropetal a 5 cm do ponto de inoculação. O patógeno foi detectado em todas plantas de todas as espécies testadas. No entanto, a população de Xcv nesse ponto foi significativamente superior em plantas de *C. giganteum* e *C. quinoa* (Figura 17).

#### 4. Discussão

A identificação de potenciais hospedeiras alternativas e estudos de interação planta-patógeno são necessários para elaboração de estratégias eficientes de manejo de doenças. A princípio, os estudos de interação entre Xcv e hospedeiras alternativas seriam realizados por meio de microscopia confocal de varredura a laser com um isolado virulento transformado com o gene da proteína verde fluorescente (GFP). No entanto, os isolados de Xcv transformados apresentaram baixa expressão da GFP, o que inviabilizou o estudo por essa metodologia. Como alternativa, a capacidade de Xcv infectar plantas de potenciais hospedeiras foi avaliada por isolamento em meio de cultura semisseletivo e detecção molecular via BIO-PCR com *primers* específicos, após inoculações em folhas e hastes.

A capacidade de Xcv infectar outras plantas, além da videira, é relatada na literatura (Nayudu, 1972; Araújo & Robbs, 2000; Peixoto et al., 2007, Santos et al., 2014). No entanto, não existem trabalhos relacionados à interação entre o patógeno e hospedeiras alternativas. No presente trabalho avaliou a capacidade de sobrevivência epifítica, colonização e translocação de Xcv em *S. obtusifolia*, espécie relatada como hospedeira alternativa, e a capacidade de colonização e translocação vascular em espécies da família Amaranthaceae (*A. cruentus*, *A. spinosus*, *C. giganteum* e *C. quinoa*).

As espécies de plantas invasoras, *Alternanthera tenella* e *Amaranthus* spp., pertencentes a família Amaranthaceae, são relatadas como hospedeiras alternativas naturais de Xcv (Peixoto et al., 2007; Santos et al., 2014). Além disso, o patógeno também foi detectado em plantas de *Amaranthus* spp., coletadas em parreirais com alta incidência do cancro bacteriano em Petrolina, no Submédio do Vale do São Francisco (Ferreira et al., 2019; Villela et al., 2019). Isolados de *Amaranthus* foram submetidos ao sequenciamento de genes de *housekeeping* e não mostraram diferenças em relação às sequências dos isolados de videira, confirmando-se tratar de Xcv (Ferreira et al., 2019). Assim, o trabalho buscou compreender aspectos da interação entre Xcv e espécies dessa família botânica.

Ensaio de patogenicidade mostraram que Xcv foi capaz infectar e causar sintomas nas plantas de todas as espécies avaliadas. Este é o primeiro relato de interação entre o patógeno e plantas do gênero *Chenopodium*. A capacidade de colonização do patógeno nas espécies testadas foi confirmada por meio de ensaios de dinâmica populacional e de progresso da expressão de sintomas. Como aqui demonstrado, diferentes espécies de bactérias fitopatogênicas foram capazes de colonizar outras plantas, além da hospedeira natural. Osdaghi et al. (2016) investigaram a capacidade de *X. euvesicatoria* colonizar espécies de plantas utilizadas em sistema de rotação com pimenta e plantas invasoras comumente associadas à essa cultura no Iran. Por meio da avaliação da dinâmica populacional do patógeno, os autores observaram que o patógeno foi capaz de colonizar plantas de *Phaseolus vulgaris* e *Solanum dulcamara*. Gonçalves et al. (2017) avaliaram a capacidade de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* colonizar as principais espécies de plantas utilizadas em sistema de rotação com o feijoeiro comum no Brasil. Os autores observam que o patógeno foi capaz de colonizar endofiticamente e epifiticamente *Triticum aestivum*, *Avena sativa*, *A. strigosa*, *Lolium multiflorum*, *Hordeum vulgare* e *Brassica napus*, em condições de campo e casa de vegetação.

Por meio dos ensaios de dinâmica da população epifítica, foi demonstrada a capacidade de Xcv colonizar e sobreviver na superfície de folhas de *S. obtusifolia*. Durante o período de avaliação, as plantas inoculadas não apresentaram sintomas. Isto se deu, provavelmente, ao método de inoculação usado, por pulverização e sem indução de ferimentos. Resultado semelhante foi observado por Fikowicz-Krosko & Czajkowski (2018), onde folhas destacadas de *S. dulcamara* não apresentaram sintomas, após a inoculação de *Dickeya solani* por pulverização. Em estudos relacionados à colonização de *D. solani* em *S. tuberosum*, Czajkowski et al. (2010) observaram que para a bactéria penetrar nos tecidos da planta e causar sintomas, foi necessário o uso do abrasivo carborundum nas inoculações, indicando a necessidade de ferimentos para a penetração da bactéria. Segundo Hirano & Upper (1983), bactérias fitopatogênicas podem colonizar superfícies de plantas hospedeiras sem induzir sintomas da doença, no entanto, sob condições favoráveis, ocorre a penetração por aberturas naturais ou ferimentos, dando início ao processo infeccioso e o desenvolvimento dos sintomas. Araújo (2001) por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura, observou intensa colonização epifítica de Xcv em hastes e folhas de videira sintomáticas e assintomáticas, coletadas em áreas de ocorrência do cancro bacteriano. O autor relata que as células bacterianas de Xcv aderem randomicamente às superfícies da planta por meio de fixação apolar em monocamada, raramente formando agregado, sendo os estômatos e os tricomas os principais sítios de colonização. Cubero et al. (2011) utilizando a técnica microscopia confocal de varredura a laser, relatam que *X. citri* pv. *citri* foi capaz de colonizar e sobreviver nas superfícies de folhas e frutos de *Citrus* sp., por meio da formação de biofilme, principalmente em depressões entre células epidérmicas e em torno dos estômatos, locais que apresentam maior umidade e presença de nutrientes. Diferentes estudos demonstram que bactérias fitopatogênicas também são capazes de colonizar e sobreviver epifiticamente em folhas saudáveis de plantas não hospedeiras (Ercolani et al., 1974; Gent et al., 2005; Osdaghi et al., 2017). Zarei et al. (2018)

demonstraram por meio da avaliação da dinâmica populacional de *X. citri* pv. *citri* e *X. arboricola* pv. *pruni*, que após inoculação em mais de 36 espécies de plantas, os patógenos foram capazes de colonizar e sobreviver na superfície foliar de diferentes plantas, dentre essas, espécies não hospedeiras.

A capacidade de colonização e translocação vascular de Xcv foi avaliada por meio da inoculação do patógeno em caule e posterior detecção e quantificação do patógeno em segmentos coletados a diferentes distâncias do ponto de inoculação. Após a inoculação, foi observado que o patógeno se translocou em plantas de todas as espécies avaliadas, indicando que a colonização de Xcv nessas espécies pode ocorrer de forma sistêmica. Araújo et al. (2004) investigaram a colonização de Xcv em tecidos de folhas e a hastes de videira por meio de microscopia ótica e eletrônica de transmissão. Os autores observaram que a bactéria se multiplica nos espaços intercelulares, coloniza o parênquima e, a partir deste, os feixes vasculares do xilema e floema adjacentes, dando início ao processo de colonização sistêmica. Apesar deste trabalho demonstrar aspectos importantes da colonização de Xcv nos tecidos vasculares da videira, os mecanismos moleculares e bioquímicos envolvidos ainda são desconhecidos.

Diversos estudos demonstraram os aspectos e/ou os mecanismos envolvidos na colonização e translocação de bactérias fitopatogênicas em tecidos vasculares das plantas hospedeiras (Bogs et al., 1998; Newman et al., 2003; Golan et al., 2010; Czajkowski et al., 2010; Chalupowicz et al., 2012; Raiol Júnior, 2017; Wang & Turechek, 2018; Montoya-Estrada et al., 2019) No entanto, em quase sua totalidade, esses estudos foram realizados em plantas da hospedeira natural. Trabalhos envolvendo hospedeiras alternativas são raros. O presente trabalho demonstrou a capacidade de colonização e translocação vascular de Xcv em *S. obtusifolia* e espécies da família Amaranthaceae. Porém, para melhor entendimento, estudos relacionados aos aspectos e os mecanismos dessa interação ainda devem ser realizados. Em

estudo mais recente, por meio da técnica de microscopia de epifluorescência associada a um isolado de transformado com gene da proteína verde fluorescente (*gfp*), Fikowicz-Krosko & Czajkowski (2018) estudaram aspectos da colonização de *D. solani* em *S. dulcamara*, espécie de planta invasora frequentemente encontrada em plantações de batata (*S. tuberosum*) na Europa. Os autores observaram que plantas de *S. dulcamara* cultivadas *in vitro* foram colonizadas sistemicamente, após a inoculação do patógeno na base do caule ou em folhas. Observações microscópicas revelaram que o patógeno colonizou o tecido da medula da raiz e os vasos do xilema do caule. Os autores também relataram que diferente do observado *in vitro*, plantas de *S. dulcamara* cultivadas em solo não apresentaram sintomas até 30 dias após a inoculação do patógeno em caule. Porém, o patógeno foi detectado em segmentos de caule coletados 5 cm acima do ponto de inoculação, com população até  $10^4$  UFC g<sup>-1</sup>.

Vários estudos comprovam a importância de plantas invasoras na sobrevivência de bactérias fitopatogênicas (Schaad & Dianese, 1981; Aysan & Uygur, 2005; Fernández-Sanz et al., 2016; Ocimati et al., 2018). *Senna obtusifolia* (fedegoso) e *A. spinosus* (caruru) são espécies de plantas invasoras com ocorrência comum em parreirais no Submédio do Vale do São Francisco. Nossos resultados mostraram a capacidade de Xcv colonizar e sobreviver nessas espécies, indicando que as mesmas podem possuir um papel importante na epidemiologia do cancro bacteriano da videira na região. Os resultados obtidos neste estudo também permitem ressaltar a importância da eliminação de plantas invasoras de *S. obtusifolia* e do gênero *Amaranthus* no manejo do cancro bacteriano da videira, como uma das formas de evitar a manutenção e/ou aumento de fontes de inóculo em áreas de ocorrência do patógeno.

## 5. REFERÊNCIAS

- Amaral, A. M., Toledo C. P., Baptista J. C., & Machado M. A. (2005). Transformation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by eletroporation. *Fitopatologia Brasileira*, 30, 292-294.
- Araújo, J. S. P. (2001). Perfil epidemiológico e subsídios para o controle de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, agente do cancro bacteriano da videira (*Vitis vinifera*) no Brasil. Tese Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil.
- Araújo, J. S. P., & Robbs, C. F. (2000). Sintomatologia, patogenicidade e controle do cancro bacteriano da videira (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*) no Brasil. *Agronomia*, 34, 83-86.
- Araújo, J. S. P., Oliveira, B. C., Olivares F. L., Reis Júnior, F. B., Cruz, G. B., Robbs, C. F., & Ribeiro, R. L. D. (2004). Imunomarcção de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* com ouro utilizando anticorpos policlonais. *Agronomia*, 38, 29-33.
- Aysan, Y. & Uygur, S. (2005). Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava*, causal agent of pith necrosis of tomato, on weeds in turkey. *Journal Plant Pathology*, 87, 135-139.
- Banzatto, D. A., & Kronka, S. N. (2006). Experimentação agrícola. Jaboticabal: FUNEP.
- Barbosa, M. A. G., Ribeiro Júnior, P. M., & Batista, D. C. (2016). Manejo do cancro bacteriano da videira no Vale do São Francisco. (In: M. A. S. Gama, A. Nicoli, L. M. P. Guimarães, & U. P. Lopes (Eds.), *Estado da Arte em Fitobacterioses Tropicais* (pp. 229-242). Recife: EDUFRPE.)
- Bogs, J., Bruchmüller, I., Erbar. C., & Geider, K. (1998). Colonization of host plants by the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* marked with genes for bioluminescence and fluorescence. *Phytopathology*, 88, 416-421.

- Chalupowicz, L., Zellermann, E. M., Flügel, M., Dror, O., Eichenlaub, R., Gartemann K. H., & Manulis-Sasson, S. (2012). Colonization and movement of GFP-labeled *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* during tomato infection. *Phytopathology*, *102*, 23-31.
- Cubero, J., Gell, I., Johnson, E. G., Redondo, A., & Graham, J. H. (2011). Unstable green fluorescent protein for study of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* survival on citrus. *Plant Pathology*, *60*, 977-985.
- Czajkowski, R., de Boer, W. J., van Veen, J. A., & van der Wolf, J. M. (2010). Downward vascular translocation of a green fluorescent protein-tagged strain of *Dickeya* sp. (biovar 3) from stem and leaf inoculation sites on potato. *Phytopathology*, *100*, 1128-1137.
- Daniels, M. J., Barber, C. E., Turner, P. C., Sawczyc, M. K., Byrde, R. J., Fielding, A. H. (1984). Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. *The EMBO Journal*, *3*, 3323-3328.
- Ercolani, G. L., Hagedorn, D. L., Kelman, A., & Rand, R. E. (1974). Epiphytic survival of *Pseudomonas syringae* on hairy vetch in relation to epidemiology of bacterial brown spot of bean in Wisconsin. *Phytopathology*, *64*, 1330-9.
- Fernández-Sanz, A. M., Rodicio, M. R., & González A. J. (2016). *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* isolated from weeds in bean crop fields. *Letters in Applied Microbiology*, *62*, 344-348.
- Ferreira, D. F. (2008). SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium*, *6*, 36-41.
- Ferreira, M. A. S. V., Bonneau, S., Briand, M., Cesbron, S., Portier, P., Darrasse, A., Gama, M. A. S., Barbosa, M. A. G., Mariano, R. L. R., Souza, E. B., & Jacques M-A. (2019). *Xanthomonas citri* pv. *viticola* affecting grapevine in Brazil: emergence of a successful monomorphic pathogen. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 489.

- Fikowicz-Krosko, J., & Czajkowski, R. (2018). Systemic colonization and expression of disease symptoms on bitterweet nightshade (*Solanum dulcamara*) infected with a GFP-tagged *Dickeya solani* IPO2222 (IPO2254). *Plant Disease*, *102*, 619-627.
- Gama, M. A. S., Mariano, R. L. R., Silva Júnior, W. J., Farias, A. R. G., Barbosa, M. A. G., Ferreira, M. A. S. V., Costa Júnior, C. R. L., Santos, L. A., & Souza, E. B. (2018). Taxonomic repositioning of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 as *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 comb. nov. and emendation of the description of *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* to include pigmented isolates pathogenic to cashew plant. *Phytopathology*, *108*, 1143-1153.
- Gent, D. H, Lang, J. M., & Schwartz, H. F. (2005). Epiphytic survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* on leguminous hosts and onion. *Plant Disease*, *89*, 558-564.
- Golan, A., Kerem, Z., Tun, O. M., Luzzatto, T., Lipsky, A., & Yedidia, I. (2010). Combining flow cytometry and *gfp* reporter gene for quantitative evaluation of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* in *Ornithogalum dubium* plantlets. *Journal of Applied Microbiology*, *108*, 1136-1144.
- Gonçalves, R. M., Schipanski, C. A., Kogushi, L., Soman, J. M., Sakate, R. K., Silva Júnior, T. A. F., & Maringoni, A. C. (2017). Alternative hosts of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, causal agent of bean bacterial wilt. *European Journal of Plant Pathology*, *148*, 357-365.
- Hirano, S. S., & Upper, C. D. (1983). Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, *21*, 243-270.
- MAPA (2018). Instrução Normativa nº 38, de 1º de outubro de 2018. <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=02/10/2018&jornal=515&pagina=14&totalArquivos=104>. Consultado em 23/06/2018.



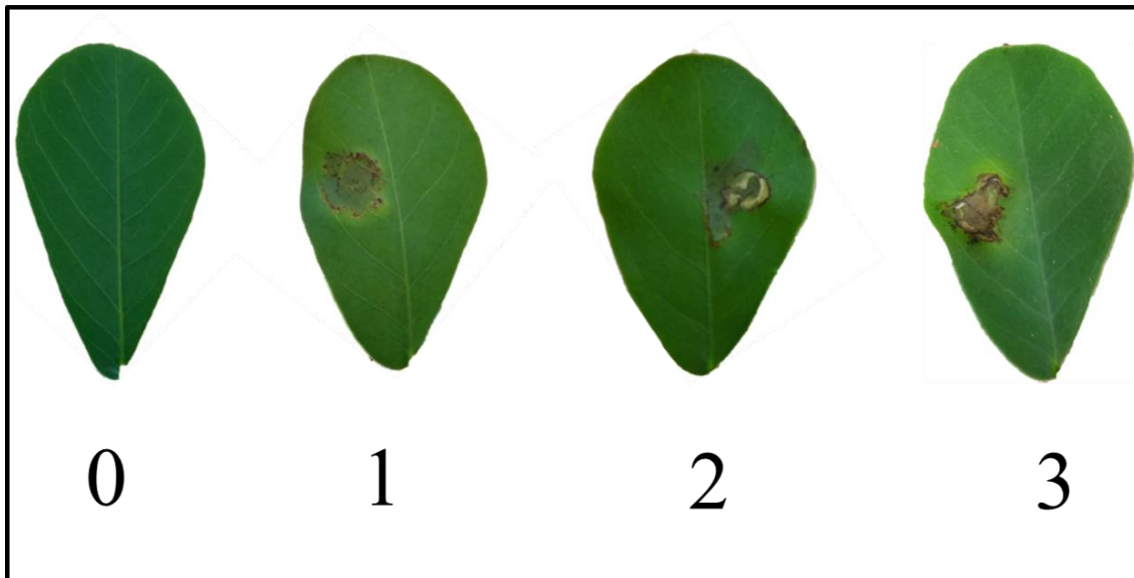
- Martins, P. M. M., Lau, I. F., Bacci, M., Belasque, J., Amaral, A. M., Taboga, S. R., & Ferreira, H. (2010). Subcellular localization of proteins labeled with GFP in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*: targeting the division septum. *FEMS Microbiology Letters*, *310*, 76-83.
- Montoya-Estrada, C. N., Costa, C. R., Badel, J. L., Guimarães, L. M., & Alfenas, A. C. (2018). Root infection and aerial colonization of eucalypt host plants by *Erwinia psidii*. *Tropical Plant Pathology*, 1-7.
- Nascimento, A. R. P., & Mariano, R. L. R. (2004). Cancro bacteriano da videira: etiologia, epidemiologia e medidas de controle. *Ciência Rural*, *34*, 301-307.
- Nascimento, A. R. P., Michereff, S. J., Mariano, R. L. R., & Viana, I. O. (2006). Reação de clones de videira a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, baseada nos componentes epidemiológicos do cancro bacteriano. *Ciência Rural*, *36*, 1-7.
- Nayudu, M. V. (1972). *Pseudomonas viticola* sp. nov., incitant of a new bacterial disease of grapevine. *Phytopathologische Zeitschrift*, *73*, 183-186.
- Newman, K.L., Almeida, R. P. P., Purcell, A. H. & Lindow, S. E. (2003). Use of a Green Fluorescent Strain for Analysis of *Xylella fastidiosa* Colonization of *Vitis vinifera*. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*, 7319-7327.
- Ocimati, W., Were, E., Groot, J. C. J., Tiftonell, P., Nakato, G. V., & Blomme, G. (2018). Risks posed by intercrops and weeds as alternative hosts to *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* in banana fields. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 1471.
- Osdaghi, E., Taghavi, S. M., Hamzehzarghani, H., & Lamichhane J. R. (2016). Occurrence and characterization of the bacterial spot pathogen *Xanthomonas euvesicatoria* on pepper in Iran. *Journal of Phytopathology*, *64*, 722-34.
- Osdaghi, E., Taghavi, S. M., Hamzehzarghani, H., Fazliarab, A., Harveson., R. M., Tegli, S., & Lamichhane, J. R. (2017). Epiphytic *Curtobacterium flaccumfaciens* strains isolated

- from symptomless solanaceous vegetables are pathogenic on leguminous but not on solanaceous plants. *Plant Pathology*, 67, 388-398.
- Peixoto, A. R., Mariano, R. D. L. R., & Viana, I.O. (2006). Semi-selective medium for isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Ciência Rural*, 36, 1317-1320.
- Peixoto, A. R., Mariano, R. L. R., Moreira, J. O. T., & Viana, I. O. (2007). Hospedeiros alternativos de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Fitopatologia Brasileira*, 32, 161-164.
- Raiol Júnior, L. L. (2017). Translocação de *Candidatus Liberibacter Asiaticus* em citros. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, Brasil.
- Santos, M. M., Peixoto, A. R., Pessoa, E. S., Gama, M. A., Mariano, R. M. R., Barbosa, M. A. G., & Paz, C. D. (2014). Identificação de potenciais plantas hospedeiras alternativas de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Ciência Rural*, 44, 595-598.
- Silva, A. M. F., Menezes, E. F., Souza, E. B., Melo, N. F., & Mariano, R. L. R. (2012). Sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em tecido infectado de videira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 34, 757-765.
- Schaad, N. W., Dianese, J. C. (1981). Cruciferous weeds as sources of inoculum of *Xanthomonas campestris* in black rot of crucifers. *Phytopathology*, 71, 1215-1220.
- Tostes, G. O., Araújo, J. S. P., Farias, A. R. G., Frade, D. A. R., & Olivares, F. L. (2014). Detection and cellular localization of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* in seeds of commercial 'Red Globe' grapes. *Tropical Plant Pathology*, 39, 134-140.
- Villela, J. G. A., Ritschel, P., Barbosa, M. A. G., Baccin, K. M., Rossato, M., Maia, J. D., & Ferreira, M. A. (2019). Detection of *Xanthomonas citri* pv. *viticola* on grapevine by real-time PCR and BIO-PCR using primers designed from pathogenicity and xanthomonadin gene sequences. *European Journal of Plant Pathology*, 1-15.

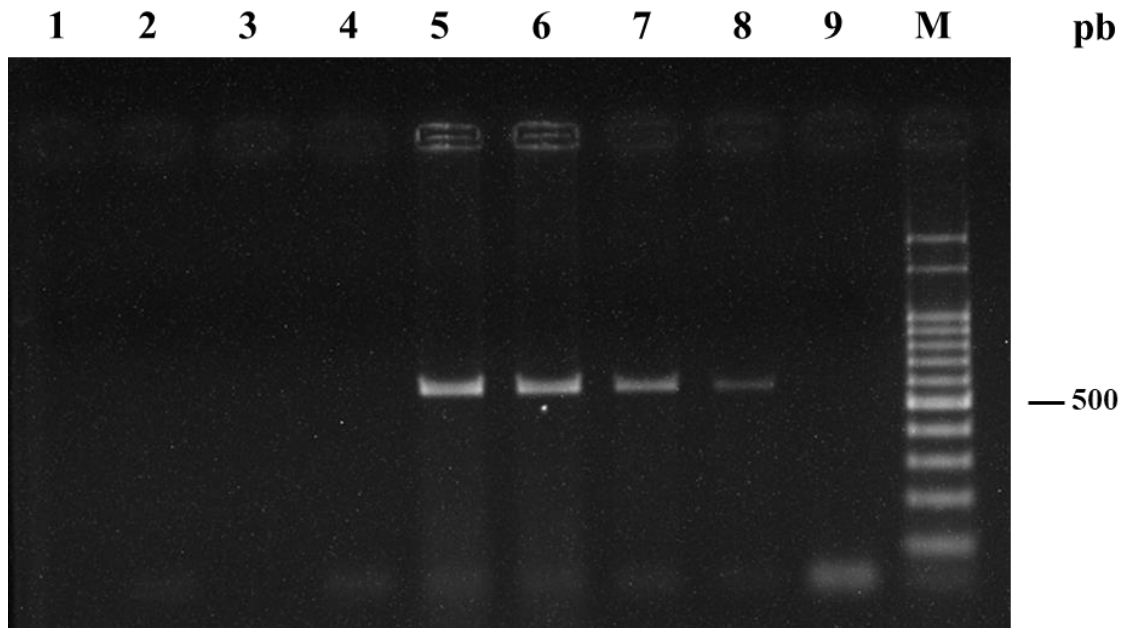
- Wang, H., McTavish, C., & Turechek, W. W. (2018). Colonization and movement of *Xanthomonas fragariae* in strawberry tissues. *Phytopathology*, *108*, 681-690.
- Zarei, S., Taghavi, S. M., Hamzehzarghani, H, Osdaghi, E., & Lamichhane, J. R. (2018). Epiphytic growth of *Xanthomonas arboricola* and *Xanthomonas citri* on non-host plants. *Plant Pathology*, *67*, 660-670.

**Tabela 1** Isolados de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* utilizados no estudo de interação com hospedeiras alternativas

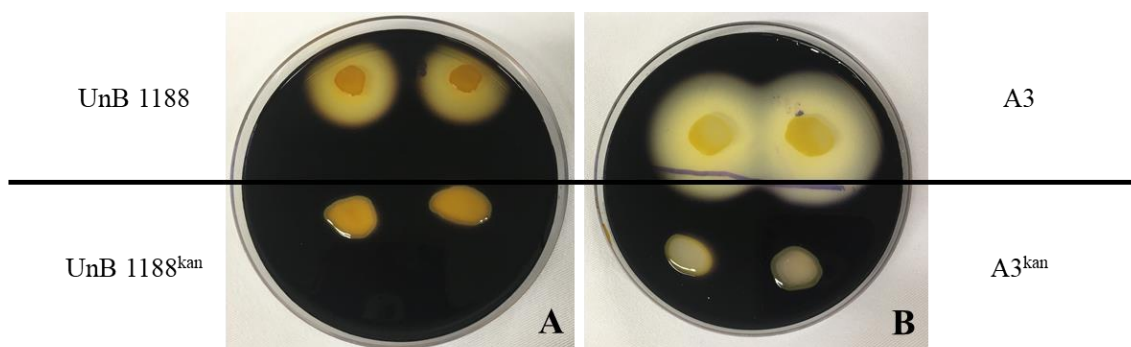
<b>Isolado</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Origem e ano de coleta</b>	<b>Característica</b>
A3	<i>Vitis vinifera</i> var. Red Globe	Petrolina - PE, 2010	Selvagem
UnB 1188	<i>Vitis vinifera</i> var. Red Globe	Petrolina - PE, 1998	Selvagem
AM1	<i>Amaranthus</i> sp.	Petrolina - PE, 2012	Selvagem
P7	<i>Vitis vinifera</i> var. Red Globe	Petrolina - PE, 2018	Selvagem
A3 <sup>kan</sup>	-	A3	Mutante
UnB 1188 <sup>kan</sup>	-	UnB 1188	Mutante



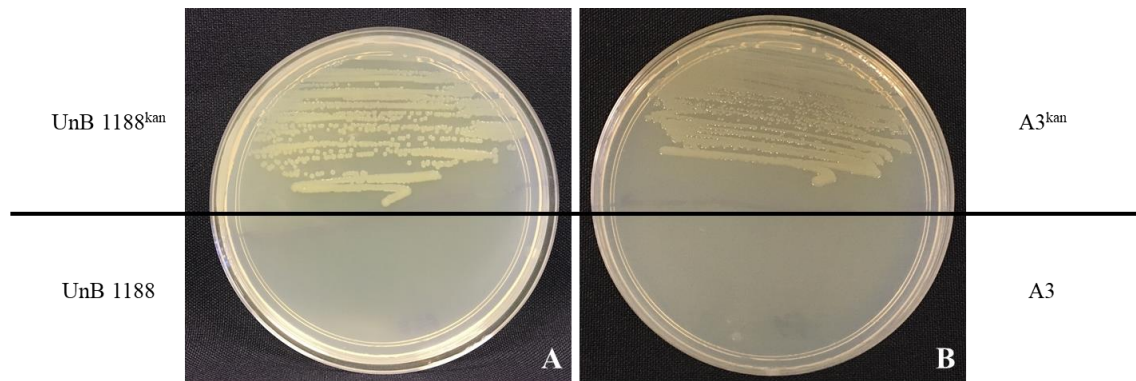
**Figura 1.** Escala de notas utilizada para quantificação da severidade de sintomas causados por *Xanthomonas citri* pv. *viticola* em *Senna obtusifolia*.



**Figura 2.** Gel de agarose (1,5 %) mostrando os produtos da PCR (598 pb), obtidos com os *primers* KanF/R que indicam a presença ou ausência do gene *aph*, que confere resistência ao antibiótico canamicina em isolados mutantes ou selvagens de *Xanthomonas citri* pv. *viticola*. Linhas 1-2: isolado selvagem A3; 3-4: isolado selvagem UnB 1188; 5-6: isolado mutante A3<sup>kan</sup>; 7-8: isolado mutante UnB 1188<sup>kan</sup>; 9: Controle Negativo PCR (água destilada esterilizada); M: Marcador 100 pb (Ludwig).

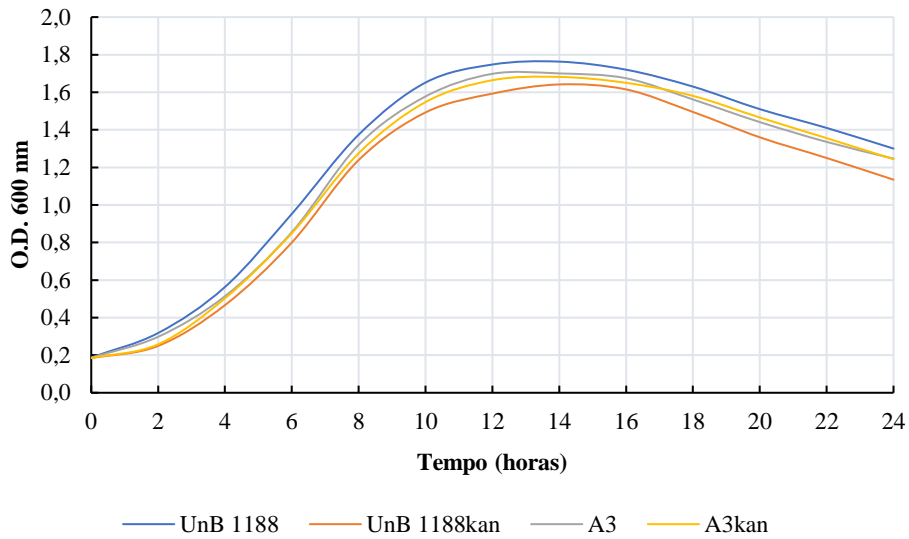


**Figura 3.** Teste da habilidade de hidrólise do amido por isolados mutantes e selvagens de *Xanthomonas citri* pv. *viticola*. A integração do vetor de expressão pPM7g no genoma da bactéria leva ao *knockout* do gene *amy*. A integração no *locus amy* pode ser detectado por cultivo dos transformantes NYG contendo amido solúvel (0,2%). Mutantes de Xcv não conseguem degradar amido e halos não são visualizados quando o meio é corado com solução de iodo lugol. A: Isolado selvagem UnB 1188 (parte superior) e isolado mutante UnB 1188<sup>kan</sup> (parte inferior). B: Isolado selvagem A3 (parte superior) e isolado mutante A3<sup>kan</sup> (parte inferior).

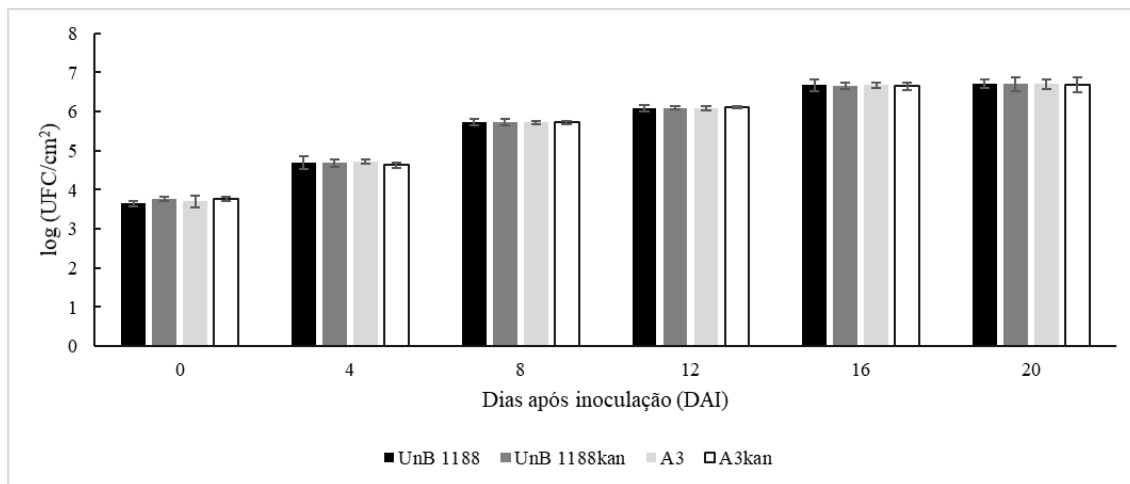


**Figura 4.** Teste de habilidade de crescimento de isolados mutantes e selvagens de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* em meio de cultura NYG acrescido de canamicina, após 48 horas a 28°C. A: Isolado mutante UnB 1188<sup>kan</sup> (parte superior) e isolado selvagem UnB 1188 (parte inferior). B: Isolado mutante A3<sup>kan</sup> (parte superior) e isolado selvagem A3 (parte inferior).

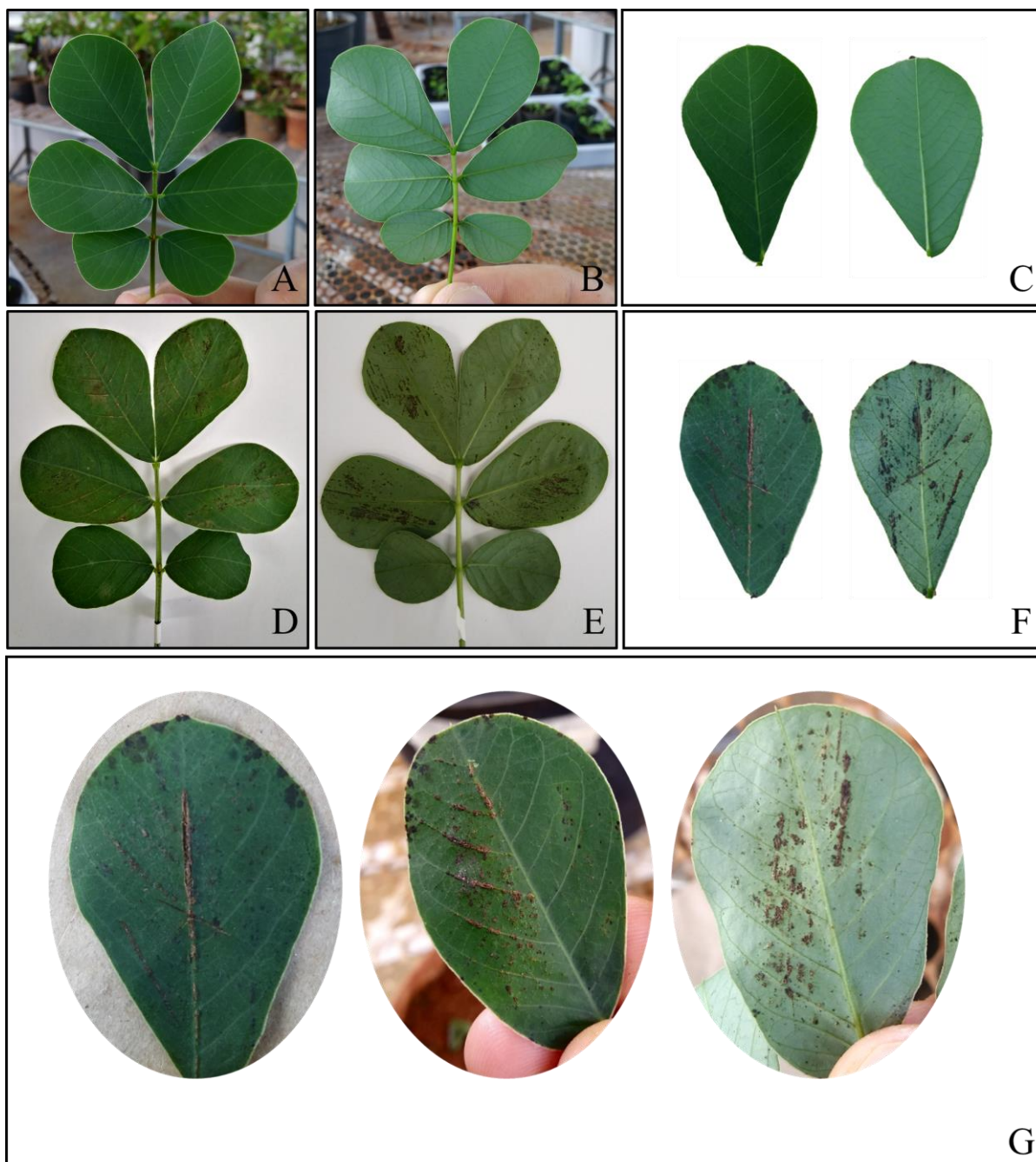




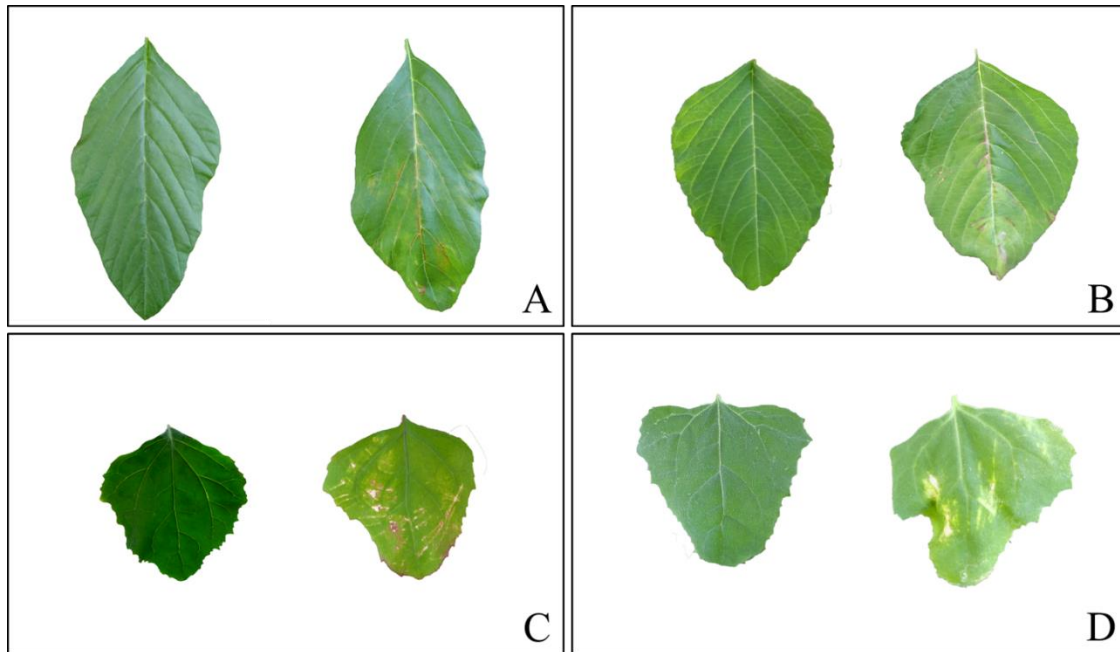
**Figura 5.** Curvas de crescimento dos isolados selvagens (UnB 1188 e A3) e mutantes (UnB 1188<sup>kan</sup> e A3<sup>kan</sup>) de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* cultivados em meio líquido (NYDA) a 28 °C, sob agitação (200 rpm) por 24 horas. Cada ponto no gráfico corresponde à média de densidades ópticas (O.D. 600nm) calculadas a partir de dados coletados em dois ensaios independentes.



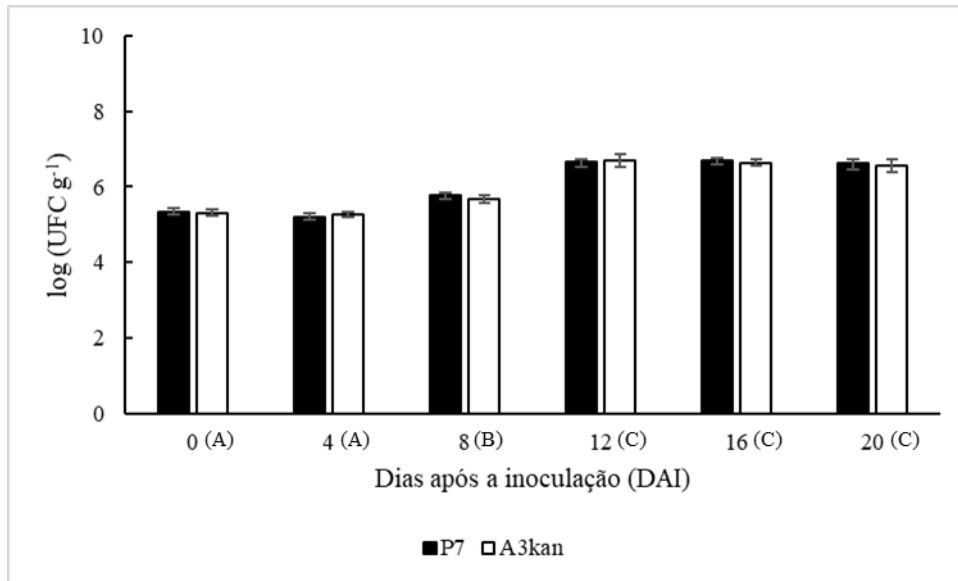
**Figura 6.** Dinâmica populacional de isolados selvagens (UnB 1188 e A3) e mutantes (UnB 1188<sup>kan</sup> e A3<sup>kan</sup>) de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* em videira da variedade Thompson Seedless, após inoculação foliar por infiltração com suspensão bacteriana ajustada para  $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>. Os resultados representam a média de dois ensaios independentes. Dias após a inoculação seguido pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



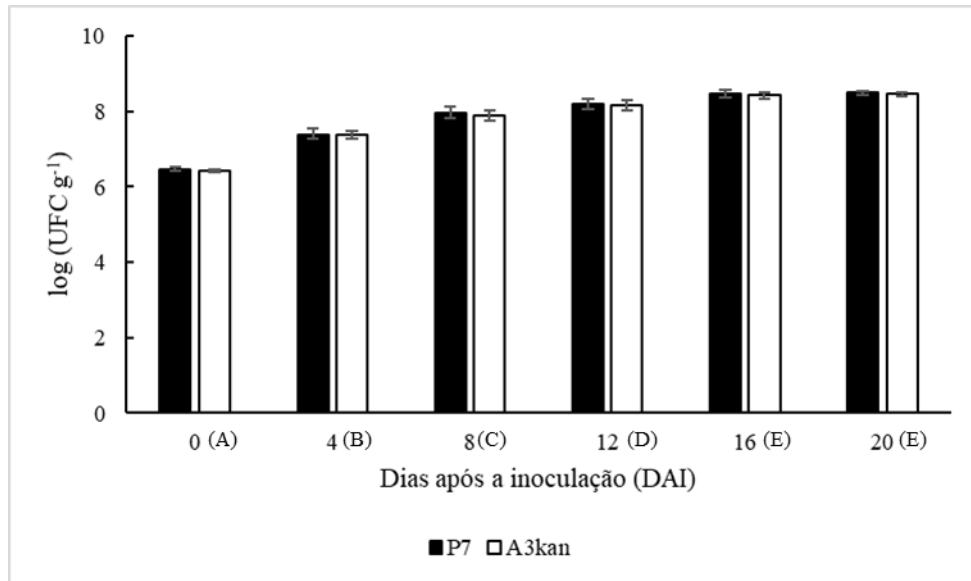
**Figura 7.** Sintomas causados por *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Xcv) em folhas e folíolos de *Senna obtusifolia*, 12 dias após inoculação de suspensão bacteriana ( $10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ) pelo método de fricção com gaze. A, B e C: Controle negativo, superfície adaxial e abaxial de folhas e folíolos inoculados com solução esterilizada sulfato de magnésio (10 mM) contendo de Tween 20 (0,05%); D, E, F: Sintomas de clorose, necrose e cancro observados em nervura e em superfície adaxial e abaxial de folhas e folíolos; G: *Close-up* dos sintomas.



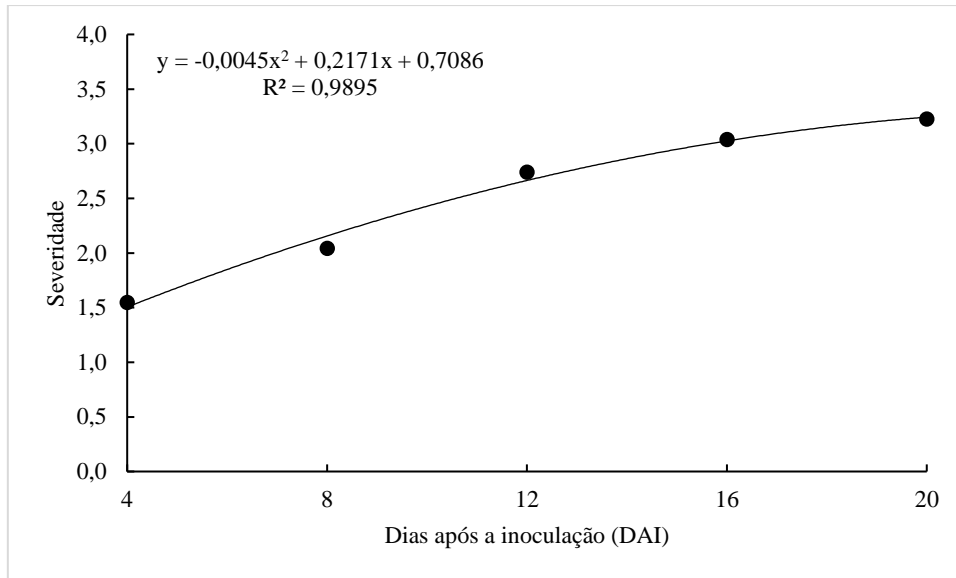
**Figura 8.** Sintomas de clorose e necrose causados por *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Xcv) em folhas de plantas pertencentes a família Amaranthaceae, 12 dias após inoculação de suspensão bacteriana ( $10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ) pelo método de fricção com gaze. Folhas do lado esquerdo de cada parte da figura representam o controle negativo, inoculação com solução esterilizada de sulfato de magnésio (10 mM) contendo Tween 20 (0,05%) e o lado direito folhas inoculadas com suspensão bacteriana ( $10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ) de Xcv pelo método de fricção com gaze. A: *Amaranthus cruentus*; B: *A. spinosus*; C: *Chenopodium giganteum*; D: *C. quinoa*.



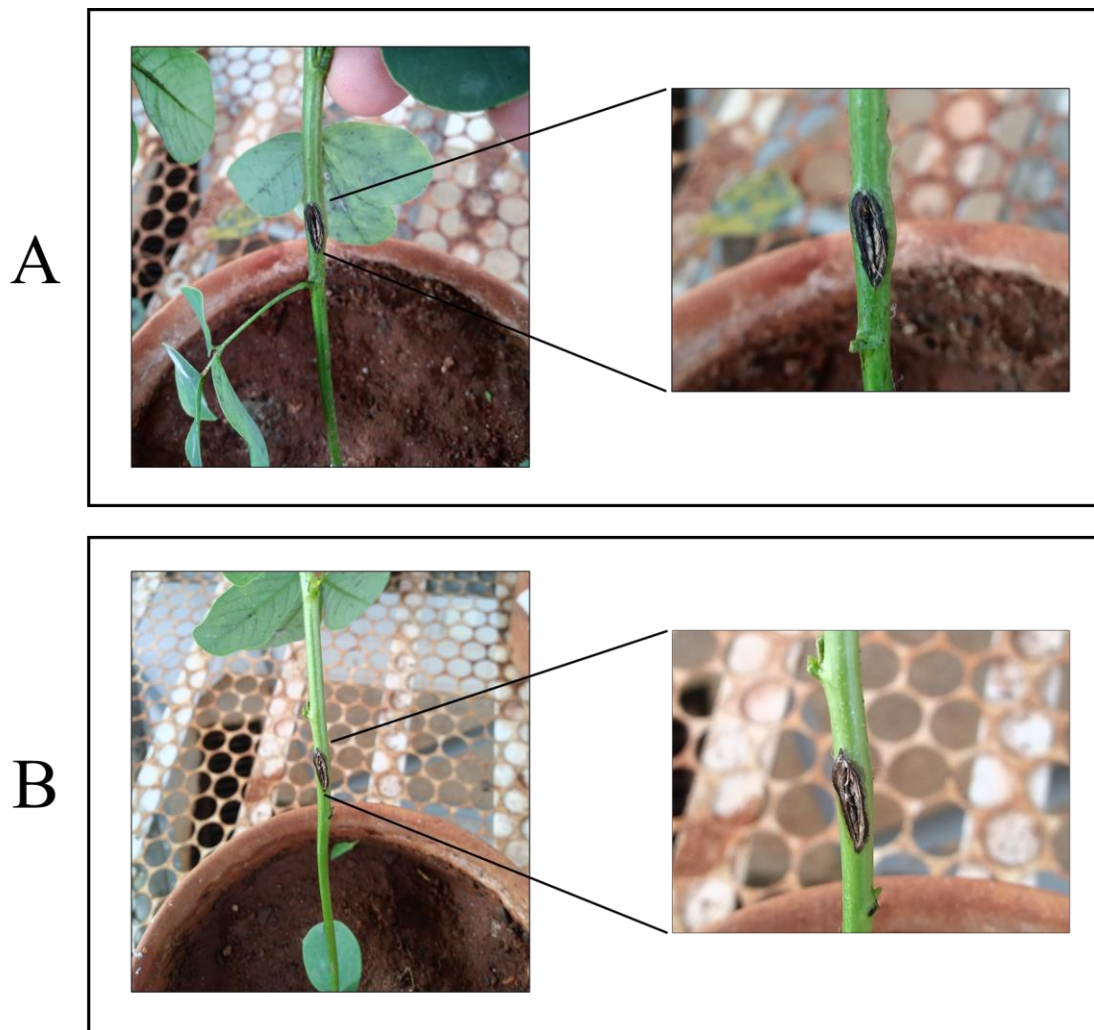
**Figura 9.** Dinâmica da população epifítica do isolado selvagem (P7) e mutante (A3<sup>kan</sup>) de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* em *Senna obtusifolia*, após inoculação por pulverização de suspensão bacteriana ( $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes. Dias após a inoculação seguido pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



**Figura 10.** Dinâmica da população total do isolado selvagem (P7) e mutante (A3<sup>kan</sup>) de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* em *Senna obtusifolia*, após inoculação por fricção com gaze umedecida com suspensão bacteriana ( $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes. Dias após a inoculação seguido pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

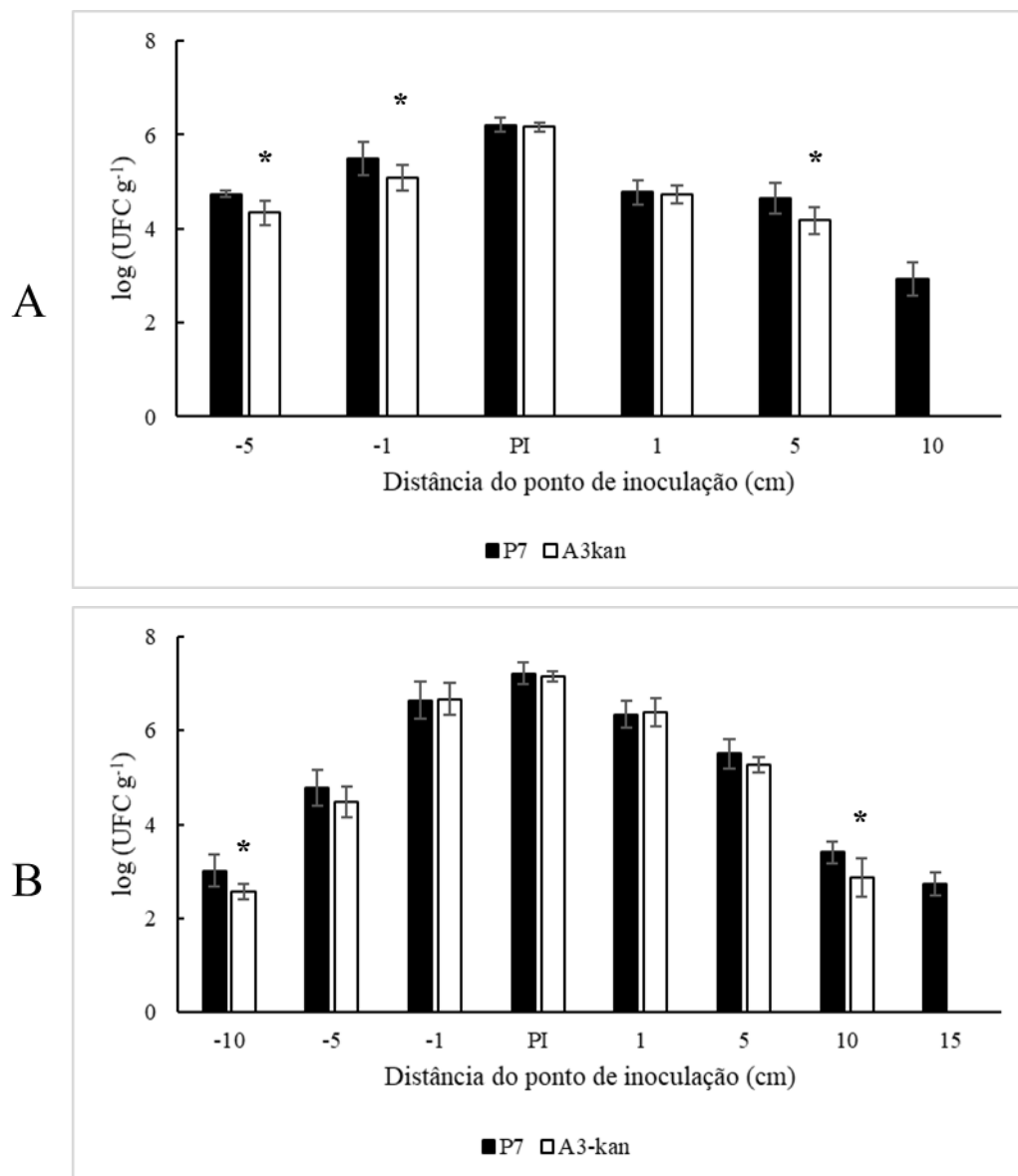


**Figura 11.** Progresso da severidade dos sintomas em folhas de *Senna obtusifolia* causados por *Xanthomonas citri* pv. *viticola*, 4-20 dias após inoculação de suspensão bacteriana ( $10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ) por infiltração.

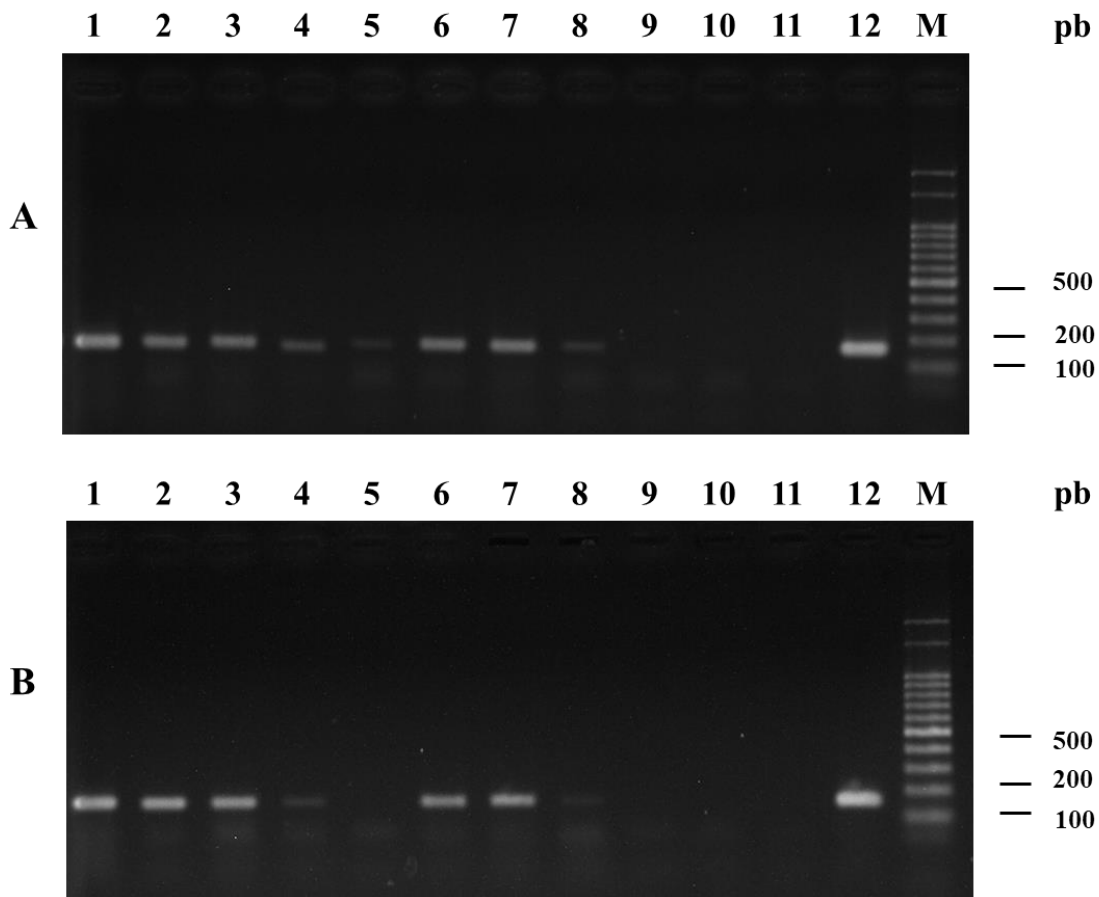


**Figura 12.** Sintoma de cancro observado em caule de *Senna obtusifolia*, 20 dias após a inoculação de *Xanthomonas citri* pv. *viticola*. As plantas foram inoculadas com os isolados selvagem e mutante, P7 (A) e A3<sup>kan</sup> (B), respectivamente.

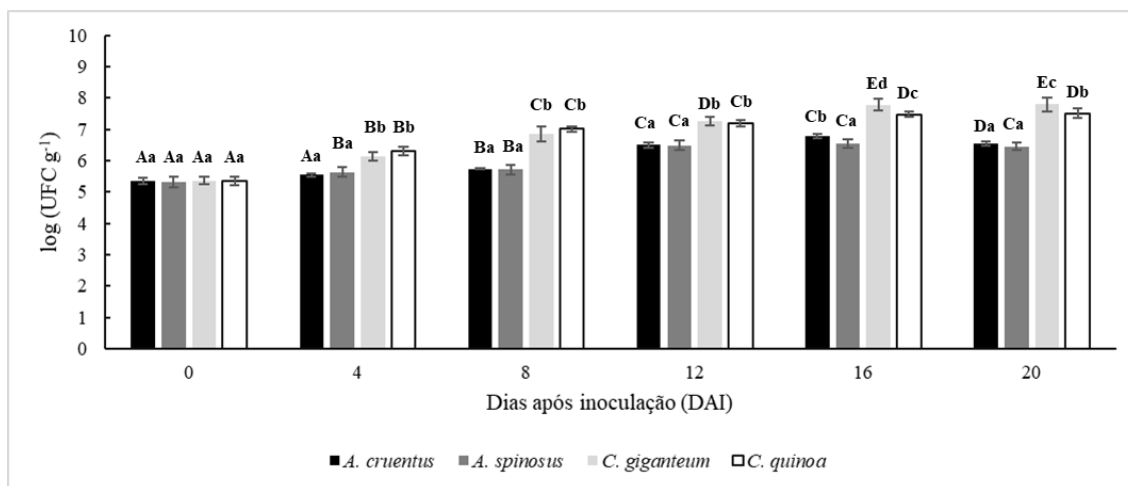




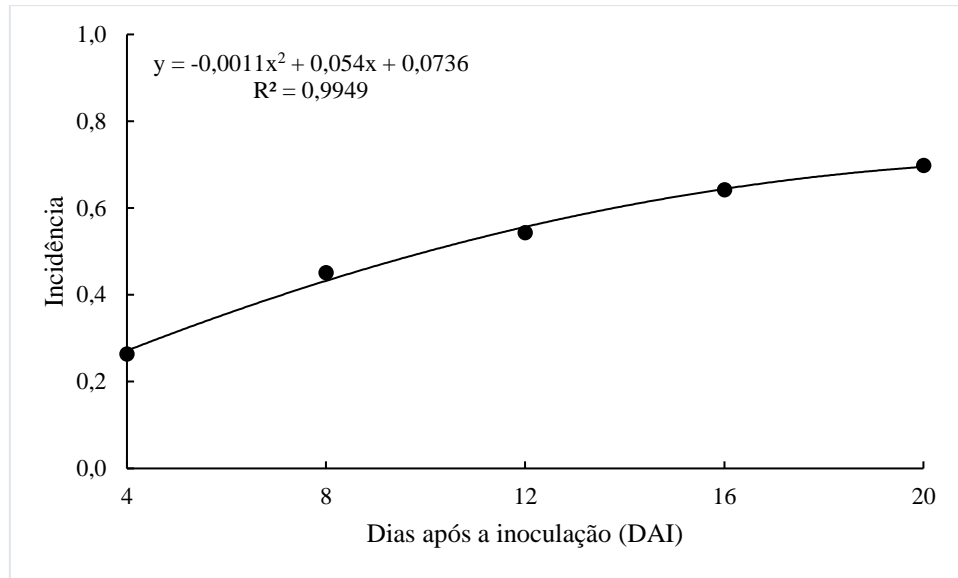
**Figura 13.** Colonização acropetal e basipetal de *Senna obtusifolia* por dois isolados de *Xanthomonas citri* pv. *viticola*, um selvagem (P7) e um mutante resistente a canamicina (A3<sup>kan</sup>). As avaliações foram realizadas aos 14 (A) e aos 21 (B) dias após a inoculação. Populações foram determinadas em segmentos de caule (1 cm) coletados a distâncias de 1, 5, 10, 15 cm acima e abaixo (-) do ponto de inoculação (PI). Asteriscos denotam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade em A3<sup>kan</sup> comparado com P7, em cada distância e tempo de avaliação.



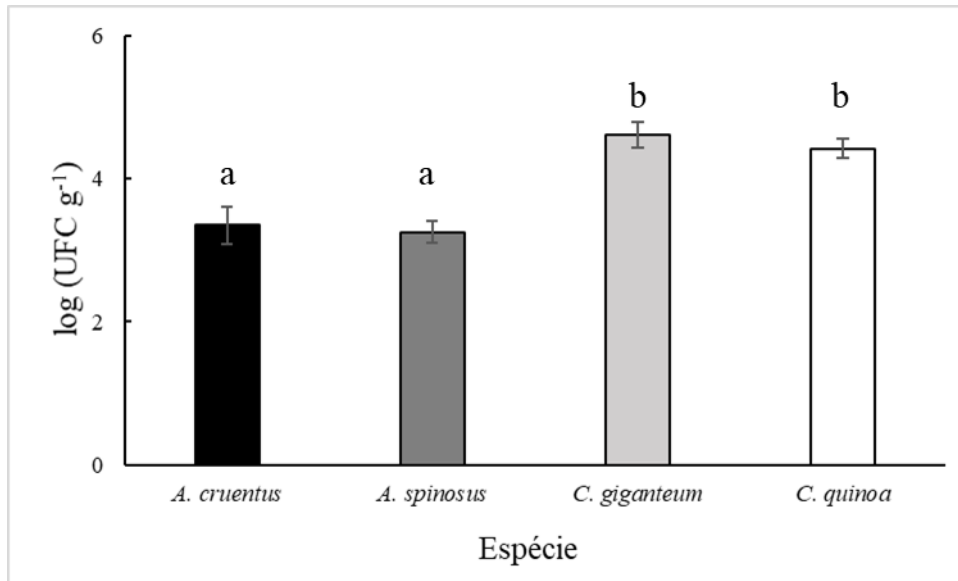
**Figura 14.** Gel de agarose (1,5 %) mostrando os produtos da PCR (166 pb), obtidos com os *primers* específicos (Xpig2F/1R) que indicam a presença ou ausência de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Xcv) em amostras de segmentos de caule de *Senna obtusifolia* coletados em diferentes distâncias acima (+) e abaixo (-) do ponto de inoculação (PI). As plantas foram inoculadas com os isolados selvagem e mutantes, P7 (A) e A3<sup>kan</sup> (B), respectivamente. Linha 1: PI; 2: +1 cm; 3: +5 cm ; 4: +10 cm; 5: +15; 6: -1 cm; 7: -5 cm ; 8: -10 cm; 9: -15; 10: Controle Negativo PCR (água destilada esterilizada); 11: Controle Negativo experimento [plantas inoculadas com solução esterilizada de sulfato de magnésio (10 mM) contendo Tween 20 (0,05%)]; 12: Controle positivo PCR [DNA Xcv (10 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ )]; M: Marcador 100 pb (Ludwig).



**Figura 15.** Dinâmica da população total do isolado AM1 de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* em espécies de plantas da família Amaranthaceae após inoculação por fricção com gaze umedecida com suspensão bacteriana ( $10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes. Colunas com a mesma letra minúscula para espécies da família Amaranthaceae e maiúscula para tempos de avaliação (dias após a inoculação) não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



**Figura 16.** Progresso da incidência de sintomas (clorose e necrose) em folhas de plantas da família Amaranthaceae causados por *Xanthomonas citri* pv. *viticola*, isolado AM1, 4-20 dias após a inoculação de suspensão bacteriana ( $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>) pelo método de fricção com gaze.



**Figura 17.** Colonização acropetal do isolado AM1 de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* em espécies de plantas da família Amaranthaceae. Populações foram determinadas em segmento de caule (1 cm) coletados a 5 cm acima do ponto de inoculação. Os resultados representam a média de dois ensaios independentes. Colunas com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

# CAPÍTULO 4

---

**Repertório de genes efetores do tipo III em *Xanthomonas citri* pv. *viticola***

## Repertório de genes efetores do tipo III em *Xanthomonas citri* pv. *viticola*

### Resumo

O presente estudo teve como objetivo principal caracterizar o repertório de genes efetores do tipo III (T3Es) em *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Xcv), agente etiológico do cancro bacteriano da videira. Por meio de análises *in silico* nos três genomas disponíveis de Xcv, pertencentes a dois isolados brasileiros (CCRMXCV 80 e CFBP 7764) e ao patotipo indiano (LMG 965), foi identificado um repertório único de 27 genes T3Es. Porém, ao analisar as sequências de cada gene, foi observada uma deleção de um nucleotídeo no gene *xopAD* do patotipo indiano, resultando em uma proteína truncada. Análises filogenéticas com os genes T3Es, *xopN* e *xopZI*, do genoma de 53 isolados de *X. citri* revelaram que Xcv possui maior proximidade genética com os patovares *vitiscarnosae* e *martyniicola*. A distribuição de 29 genes T3Es de *Xanthomonas* spp., incluindo 20 dos genes detectados nos genomas de Xcv, foi determinada por PCR em uma coleção de 68 isolados de Xcv. A diversidade de virulência dos isolados de Xcv em videira também foi avaliada com o objetivo de investigar possível correlação com a distribuição dos genes T3Es. Como resultado, foram detectados 22 genes T3Es, presentes em todos os isolados. Análises estatísticas por agrupamento, com os componentes, severidade de sintomas e população do patógeno, 12 dias após a inoculação, revelaram seis grupos de virulência. No entanto, os seis grupos compartilham os mesmos 22 genes T3Es. Os dados aqui obtidos podem ser úteis em estudos de identificação de genes de resistência e/ou seleção de genótipos de videira resistentes ao cancro bacteriano, que devem levar em consideração o perfil de virulência e os efetores conservados em Xcv.

**Palavras-chave:** cancro bacteriano da videira, filogenia, efetores “non-TAL”, diversidade, virulência

## Repertoire of type III effector genes of *Xanthomonas citri* pv. *viticola*

### Abstract

The present study aimed to characterize the repertoire of type III effector genes (T3Es) in *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Xcv), causal agent of grapevine bacterial canker. *In silico* analyses of the three available genomes of Xcv, from two Brazilian strains (CCRMXCV 80 and CFBP 7764) and the Indian pathotype (LMG 965), showed no differences in the repertoire of 27 T3Es genes. However, by analyzing the sequences of each gene, a deletion of a nucleotide in the *xopAD* gene of the Indian pathotype was observed, resulting in a truncated protein. Phylogenetic analyses with the T3Es genes, *xopN* e *xopZ1*, from 53 *X. citri* genomes revealed that Xcv is closely related to pathovars *vitiscarnosae* e *martyiicola*. The distribution of 29 T3Es genes from *Xanthomonas* spp., including 20 genes detected in Xcv genomes, was determined by PCR in a collection of 68 Xcv strains. The virulence diversity of Xcv strains in grapevine was also evaluated in order to investigate correlation with the distribution of T3Es genes. As a result, 22 T3Es genes were detected, present in all strains and six virulence subgroups were identified. Statistical analyses by clustering, using data from severity of symptoms and final Xcv population 12 days after inoculation on grapevine leaves, revealed six subgroups. However, these subgroups shared the same 22 T3Es genes. The results obtained here may be useful for identification of grapevine resistance genes and selection of bacterial canker resistant grapevine genotypes, which should take into account virulence profiles and the conserved effectors in Xcv.

**Keywords:** grapevine bacterial canker, phylogeny, non-TAL effectors, diversity, virulence



## 1. Introdução

O cancro bacteriano, causado por *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Xcv), é a doença de maior importância econômica na cultura da videira no Vale do Submédio do São Francisco, principal região produtora e exportadora de uvas de mesa do Brasil (Gama et al., 2018; Lazzarotto & Fioravanço, 2013). Devido à sua ocorrência restrita e por representar risco ao desenvolvimento da viticultura nacional, o agente etiológico da doença é regulamentado como uma Praga Quarentenária Presente (PQP) (MAPA, 2018). Devido ao *status* econômico e regulatório, a diversidade de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Xcv), foi avaliada e caracterizada em diferentes estudos, tendo como objetivo, obter métodos eficientes de diagnose e controle. Análises realizadas por rep-PCR indicaram a existência de baixa diversidade genética entre isolados brasileiros de Xcv, não sendo possível correlacionar os polimorfismos observados entre os isolados com a variedade de origem, local ou época de coleta (Trindade et al., 2005; Marques, 2007; Gama et al., 2018). No entanto, elevada diversidade foi detectada em uma coleção de isolados brasileiros quanto à virulência em videira e sensibilidade ao cobre (Gama, 2014; Marques et al., 2009). Ferreira et al. (2019) analisaram a diversidade de Xcv por MLVA (*multilocus variable number of tandem repeats analysis*) com oito *loci* VNTR (*variable number of tandem repeats*) derivados do genoma de *X. citri* pv. *citri* (306). Como resultado, os autores obtiveram melhor resolução para detecção da diversidade do patógeno, sendo possível detectar complexos clonais, e separar com clareza os isolados brasileiros dos isolados indianos.

Marcadores sob pressão seletiva, como genes associados à patogenicidade, têm sido utilizados em estudos de diversidade de diferentes espécies de *Xanthomonas* (Jaciani et al., 2012; Mondal et al., 2014; Trujillo et al., 2014). Alguns desses genes associados à patogenicidade codificam para uma classe particular de proteínas, denominadas efetores.

A patogenicidade e virulência da maioria das bactérias fitopatogênicas Gram-negativas, dependem da translocação de um repertório de efetores do tipo III (T3Es) para o interior da célula vegetal, onde conseguem bloquear as defesas do hospedeiro, permitindo assim a sobrevivência e multiplicação do patógeno (Jiang et al., 2008; Jiang et al., 2009). A translocação dessas proteínas ocorre pelo sistema de secreção do tipo III (T3SS), um complexo proteico codificado pelo *cluster* gênico *hrp* (*hypersensitivity response and pathogenicity*) (Alfano & Collmer, 2004; Gürlebeck et al., 2006).

A maioria das bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas* produzem um extenso repertório T3Es, que usam uma variedade de mecanismos bioquímicos para direcionar funções específicas no hospedeiro (Kay et al., 2007; Sinha et al., 2013; Teper et al., 2014). Duas classes amplas de T3Es são reconhecidas em *Xanthomonas*: efetores TAL (*transcription activator like*) e efetores “non-TAL”. Os efetores TAL atuam ativando a expressão de genes no hospedeiro e são caracterizados por possuírem uma estrutura de domínios semelhantes, composta por três regiões básicas, uma região N-terminal, um domínio central repetitivo e uma região C-terminal ácida (Ryan et al., 2011). Entretanto, os efetores “non-TAL” atuam de forma enzimática e apresentam estrutura diversificada (Kay & Bonas, 2009).

Estudos de identificação do repertório de genes T3Es em diferentes espécies de *Xanthomonas* foram realizados. Esses estudos revelaram que os repertórios de genes T3Es diferem entre espécies e entre patovares, sugerindo que os mesmos são um dos principais determinantes na gama de hospedeiros (Hajri et al., 2009; Hajri et al., 2012ab). Dentro do patovar, variações no repertório de genes T3Es foram relacionadas à hospedeira de origem (Hajri et al., 2009; Hajri et al., 2012a) e origem geográfica dos isolados (Escalon et al., 2013), e em outros, nenhuma correlação foi observada (Bart et al., 2012; Gordon et al., 2015; Guy et al., 2013; Roux et al., 2015). Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo caracterizar

o repertório de genes T3Es em isolados de Xcv e investigar correlações com origem geográfica, hospedeira de origem e virulência em videira.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Repertório de genes T3Es em patovares de *X. citri***

Para comparar o repertório de genes T3Es entre 27 diferentes patovares de *X. citri*, os genomas completos de 53 isolados foram baixados do GenBank (Tabela 2). Os isolados do mesmo patovar foram selecionados de locais e/ou hospedeiros distintos, dando preferência aos genomas com mapas completos ou com menor número de *scaffolds*. O repertório de efetores em cada isolado foi determinado *in silico*, por meio de pesquisas de similaridade utilizando a ferramenta TBLASTN, disponível no *software* Geneious R8 (Kearse et al., 2012), tendo como referência as sequências de aminoácidos de proteínas T3Es disponíveis na página de recursos Xanthomonas (<http://www.xanthomonas.org/t3e.html>). Para o efector XopAG, além da sequência disponível, também foi utilizado como referência a sequência do gene *avrGfl* (*xopAG*) (GenBank: DQ275469), sendo essa convertida em uma sequência de aminoácidos para realização das pesquisas de similaridade por TBLASTN. Genes T3Es foram considerados presentes no genoma quando a sequência de aminoácidos obtida pelo alinhamento apresentou pelo menos 80% do comprimento total da proteína de referência e no mínimo 45% de similaridade, conforme descrito por Bart et al. (2012). Mutações *frameshift* nos genes T3Es resultando em proteínas truncadas foram identificadas verificando-se a posição do códon de parada.

### **2.2. Análises de sequências de genes T3Es em patovares de *X. citri***

Após a identificação dos genes T3Es presentes nos genomas dos isolados de *X. citri*, cinco genes, presente na maioria dos isolados foram selecionados para análises filogenéticas.

Considerando a natureza codante das regiões genômicas selecionadas, o conjunto de dados foi alinhado utilizando o *software* MACSE (*Multiple Alignment of Coding Sequences*) (Ranwez et al., 2011) e submetido a checagem manual para confirmação da qualidade do alinhamento. Após identificadas as porções correspondentes às primeiras, segundas e terceiras posições codantes, foram realizadas reconstruções filogenéticas utilizando o método de otimização por Máxima Verossimilhança no *software* RAXML 8.2.9 (Stamatakis, 2014), com partições correspondentes às respectivas posições. O modelo misto de partições permite a estimativa de parâmetros independentes para cada posição codante, os quais são utilizados para seleção das árvores filogenéticas através do modelo GTR+GAMMA. Após selecionada a melhor árvore filogenética, o suporte dos ramos foi calculado por *Bootstrap* com 1.000 réplicas.

### **2.3. Isolados bacterianos: identificação, preservação e cultivo**

Os isolados de bacterianos utilizados no estudo estão listados na Tabela 1. Foi montada uma coleção de trabalho contendo 67 isolados brasileiros de *Xcv*, coletados desde o primeiro relato do patógeno no país, em 1998, até o ano de 2018 e o patotipo indiano (NCPPB 2475), perfazendo um total de 68 isolados. Todos os isolados de *Xcv* foram previamente identificados por PCR utilizando os *primers* específicos Xpig2F/1R (Villela et al., 2019) e preservados em água destilada esterilizada à temperatura ambiente e em glicerol 30% a -20 °C. Para preparo de suspensões bacterianas os isolados foram cultivados nos meios 523 (Kado & Heskett, 1970) ou NYDAM (Peixoto et al., 2006) a 28°C por 2-3 dias.

### **2.4. Detecção de genes T3Es em isolados de *Xcv***

A distribuição de genes T3Es na coleção de isolados de *Xcv* foi determinada com base na presença ou ausência de amplificação de sequências parciais de 29 genes. Os genes T3Es foram selecionados tendo como referência os genomas de *X. citri* pv. *citri* (306), *X. campestris*

pv. *campestris* (8004, ATCC 33913 e B-100), *X. euvesicatoria* (85-10) e *Xcv* (LMG 965; CCRMXCV 80 e CFBP 7764) (da Silva et al., 2002; Qian et al., 2005; Thieme et al., 2005; Vorhölter et al., 2008; Midha & Patil, 2014; Lima et al., 2017; Ferreira et al., 2019). A distribuição genes T3Es foi determinada por PCR seguida de eletroforese em gel de agarose. Nas reações foram utilizados *primers* específicos descritos por Mokryakova et al. (2010), Hajri et al. (2012) e Escalon et al. (2013), os quais amplificam sequências parciais de cada gene (Tabela 3). Para amplificação do gene *xopAD*, *primers* específicos foram desenhados com base em sequências completas extraídas dos genomas disponíveis de *Xcv*. Os *primers* foram desenhados utilizando *plugin* Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000) no *software* Geneious R8. As reações foram realizadas em termociclador My Cycler (Bio-Rad) com volume final de 12 µl, contendo 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM de cada iniciador, 1X GoTaq® buffer (Promega), 0,4 U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega) e 2 µl de suspensão de células bacterianas (10<sup>7</sup> UFC ml<sup>-1</sup>). O programa de amplificação consistiu de um ciclo inicial de desnaturação de 95 °C por 2 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 45 s, anelamento de 64-68 °C (Tabela 3), por 45 s, extensão a 72 °C por 0,5 a 2 min, dependendo do comprimento do produto de PCR (1 Kb/min) e extensão final a 72 °C por 10 min. Em todas os experimentos, uma suspensão bacteriana (10<sup>7</sup> UFC ml<sup>-1</sup>) de um isolado da espécie cuja sequência do gene efetor foi utilizada com referência foi incluída como controle positivo da PCR. Como controle negativo, utilizou-se uma reação com água destilada esterilizada. Os isolados utilizados como controle positivo nas reações foram: UnB 92 (*X. citri* pv. *citri*); CFBP 7764 (P1S6) e NCPPB 2475 (LMG 965) (*Xcv*); EH 2009-130 (*X. euvesicatoria*) e UnB 1394 (*X. campestris* pv. *campestris*). Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão 0,5X TBE (Tris 50 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM, ácido bórico 50 mM [pH 8,3]), corados com brometo de etídio (0,5 µg ml<sup>-1</sup>) e registrados em fotodocumentador L-PIX ST (Loccus Biotecnologia).

## 2.5. Virulência de isolados de Xcv em videira

A diversidade de virulência dos isolados de Xcv foi caracterizada por meio da quantificação da severidade dos sintomas e da população do patógeno, após a inoculação em videira. Uma subcoleção de 34 isolados foram utilizados. Os isolados foram selecionados de forma que representassem a diversidade da coleção em termos de ano de coleta, hospedeiro (variedades de videira e *Amaranthus* sp.) e origem geográfica. Foram utilizadas plantas de videira (*Vitis vinifera*) da variedade Sagraone, mantidas em vasos e em condições casa de vegetação. Suspensões bacterianas preparadas em água destilada esterilizada a partir de culturas puras de cada isolado. As concentrações das suspensões foram ajustadas para  $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>, com auxílio de espectrofotômetro (Shimadzu Corporation, Japão) para leituras de O.D. 550 nm e absorvância de 0,575. Em seguida, 100 µl da suspensão foram infiltrados com auxílio de seringa hipodérmica sem agulha na superfície abaxial do limbo foliar. O controle negativo do experimento foi constituído de folhas inoculadas com água destilada esterilizada. Após as inoculações, as plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura em torno de  $27 \pm 3$  °C e umidade relativa de 75%. As avaliações ocorrem 12 dias após a inoculação. A severidade dos sintomas foi avaliada por meio da elaboração de uma escala de notas que varia de 0 a 4, onde: 0 = sem sintoma; 1 = lesão clorótica; 2 = lesão encharcada; 3 = lesão encharcada com pontos necróticos; 4 = lesão necrótica. Para quantificar a população dos isolados, quatro fragmentos (1 cm<sup>2</sup>) por repetição foram recortados a partir do ponto de inoculação e esmagados em cadinho contendo 4 ml de água destilada esterilizada. Em seguida cada amostra foi diluída em série (1:10) até  $10^{-4}$  e 100 µl de cada diluição foram plaqueados em meio NYDAM. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento (isolados de Xcv), sendo cada repetição constituída por uma folha com quatro pontos de inoculação por folha. Todos os ensaios foram repetidos uma vez. Os dados amostrados foram submetidos à análise de variância com a realização do teste F e as médias dos tratamentos

foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade (Banzatto & Kronka, 2006). As análises foram realizadas, utilizando o programa Sisvar, versão 5.3 (Ferreira, 2008).

Durante e após todos os ensaios, os materiais biológicos (plantas inoculadas, suspensões de células, culturas ou DNA), vidrarias e plásticos foram submetidos à descontaminação em autoclave (121°C por 30 min).

### **3. Resultados**

#### **3.1. Repertórios e análises de genes T3Es em patovares de *X. citri***

Com objetivo de comparar o repertório de genes efetores T3Es entre patovares de *X. citri*, foram realizadas análises *in silico* em genomas disponíveis de diferentes isolados. Devido à natureza repetitiva dos genes T3Es da classe TAL, estudá-los em *draft* genomas torna-se complexo. Assim, foram analisados apenas os efetores da classe “non-TAL”. Após análises em vários *loci* associados aos T3Es, verificamos que um total de 43 genes compõe o repertório de *X. citri*. Deste total, os genes *hpaA*, *xopA*, *xopN*, *xopQ*, *xopZ1* foram encontrados nos genomas de todos isolados analisados, exceto do isolado CFBP 7767, pertencente ao patovar *fuscans*, onde foram observadas mutações nos genes *xopN* e *xopZ1* que resultam em proteínas truncadas. Os genes *avrBs2*, *xopAK*, *xopAU*, *xopAZ*, *xopE1*, *xopK* e *xopX* foram encontrados na maioria dos genomas, com poucas (1 a 4) exceções. O tamanho do repertório de genes T3Es variou de 19 a 32 genes, sendo constatadas diferenças em sua composição, até mesmo entre isolados do mesmo patovar (Tabela 4).

Nos genomas de Xcv, foram encontrados 27 genes T3Es. Análises das sequências de cada gene T3E por alinhamento revelaram ausência de polimorfismos, exceto para o gene *xopAD*, do patotipo indiano, onde foi identificado uma deleção de um nucleotídeo na posição 1384, que resulta na tradução de uma proteína truncada (Figura 1).

Após a determinação do repertório de genes T3Es nos isolados de *X. citri*, os genes *hpaA*, *xopA*, *xopN*, *xopQ* e *xopZ1* foram selecionados para análises filogenéticas. Árvores foram construídas com base na análise das sequências de cada gene separadamente (Figuras 2 a 6). As árvores geradas assumiram topologias diferentes, indicando que estes genes passaram por eventos evolutivos distintos. De acordo com as árvores obtidas a partir da análise dos genes *xopN* e *xopZ1*, os isolados pertencentes ao patovar *viticola*, foco do presente estudo, foram reconhecidos como filogeneticamente próximos aos isolados pertencentes aos patovares *vitiscarnosae* e *martyinicola*.

### **3.2. Detecção de genes T3Es e diversidade de virulência em isolados de Xcv**

A distribuição de 29 genes T3Es na coleção de isolados de Xcv foi determinada com base na presença ou ausência de *amplicons* de tamanho esperado após PCR. Foi detectado um total de 22 genes, distribuídos homogeneamente em todos os isolados. Os genes T3Es detectados foram: *avrBs2*, *hpaA*, *xopA*, *xopAD*, *xopAE*, *xopAI*, *xopAK*, *xopB*, *xopC2*, *xopE1*, *xopE3*, *xopI1*, *xopJ5*, *xopK*, *xopL*, *xopN*, *xopP*, *xopQ*, *xopR*, *xopV*, *xopX* e *xopZ1*. Os resultados de PCR foram compatíveis com os obtidos pelas análises *in silico*, ou seja, todos os genes detectados por PCR também foram constatados nos genomas disponíveis de Xcv. No entanto, a tradução dos genes *xopI1* e *xopJ5* encontrados nos genomas resultam em proteínas truncadas, devido à ocorrência de mutações.

A avaliação e caracterização da diversidade de virulência em isolados de Xcv foi realizada por meio de análises estatísticas por agrupamento com os componentes, severidade de sintomas e população do patógeno 12 dias após a inoculação em folhas de videira. Após as análises foram identificados seis grupos de virulência (A – F) (Tabela 5). O grupo C abrigou maior número de isolados (11), com severidade variando de 2,94 a 3,22 e população em torno



de  $10^6$  UFC ml<sup>-1</sup>. Foi observado correlação positiva entre os componentes avaliados, ou seja, quanto maior a severidade dos sintomas maior a população do patógeno no tecido foliar.

#### 4. DISCUSSÃO

O conhecimento da diversidade genética de fitopatógenos auxilia o entendimento sobre a evolução das espécies, além de ser uma demanda para o desenvolvimento de métodos eficientes de diagnose e controle. Embora estudos da caracterização da diversidade genética de isolados brasileiros de Xcv por rep-PCR (Trindade et al., 2005; Marques, 2007), MLVA (Ferreira et al., 2019), sensibilidade/tolerância ao cobre (Marques et al., 2009) e caracterização polifásica (variabilidade metabólica, molecular e epidemiológica) (Gama, 2014; Gama et al., 2018) tenham sido realizados, não era conhecido a diversidade de repertório de genes T3Es de isolados brasileiros, nem se o mesmo estava relacionado à hospedeira (videira ou *Amaranthus* sp.) ou à virulência de isolados desse patovar em videira.

Análises realizadas *in silico* em 53 genomas de *X. citri* revelaram variações no repertório de genes T3Es entre os patovares e entre isolados de um mesmo patovar. Hajri et al. (2009) avaliaram a diversidade de repertório de genes T3Es em 132 isolados pertencentes a diferentes espécies e patovares de *Xanthomonas*. Como resultado, os autores observaram alta correlação entre a composição do repertório e o patovar de determinada espécie. Escalon et al. (2013) identificaram um repertório de 28 genes em *X. citri* pv. *citri*, dos quais 26 foram compartilhados por todos os 55 isolados analisados, enquanto dois (*xopAG* e *xopC1*) estavam presentes apenas em alguns isolados dos patótipos A\* e A<sup>W</sup>. No entanto, os autores concluíram que essa variação no repertório de *X. citri* pv. *citri* não explica a especialização de hospedeiro entre patótipos.

Por meio de análises em sequências dos genes T3Es conservados (*hpa*, *xopA*, *xopN*, *xopQ* e *xopZ1*) de 53 genomas de *X. citri* foi identificado elevado número de polimorfismos, entre patovares e entre isolados do mesmo patovar. Análises filogenéticas realizadas com as

sequências completas dos genes *xopN* e *xopZI* revelaram que o patovar *viticola* possui maior proximidade genética com *vitiscarnosae*, *martyiicola*. Comparando o repertório de genes T3Es dos isolados pertencentes a estes patovares foi verificado que os mesmos possuem tamanhos próximos (26-27) com poucas diferenças em sua composição. Ferreira et al. (2019) por meio de inoculação artificial constatou que o isolado CFBP 7658 pertencente ao patovar *vitiscarnosae* foi capaz de causar sintomas em folhas e haste de videira da variedade Sauvignon, sendo este resultado confirmado pelo isolamento do patógeno. Hajri et al., (2012b), investigaram a distribuição de 53 genes efetores T3Es em uma coleção de 57 isolados de *X. arboricola*. Como observado neste trabalho, para *X. citri*, os repertórios de T3Es em patovares de *X. arboricola* apresentaram alta diversidade em termos de composição e tamanho. Os autores também identificaram várias diferenças no conteúdo de genes T3Es entre os patovares *pruni*, *corylina* e *juglandis*. Os resultados aqui observados foram compatíveis com os descritos por Hajri et al. (2009) e Hajri et al., (2012b), indicando que o repertório de genes T3Es e as sequências de cada gene, possuem papel importante na determinação da gama de hospedeiros em *X. citri*.

Análises *in silico* nos três genomas disponíveis de Xcv, pertencentes a dois isolados brasileiros e ao patotipo indiano, revelaram um repertório comum de 27 genes T3Es conhecidos, que corresponde ao tamanho médio dos repertórios de *Xanthomonas* descritos (<http://www.xanthomonas.org/t3e.html>). Ao analisar o conteúdo das sequências de cada gene, foi identificada uma deleção de um nucleotídeo na sequência do gene *xopAD* do patotipo indiano, resultando em uma proteína truncada. Também investigamos por PCR, com *primers* específicos, a distribuição de 29 genes efetores T3Es em uma coleção representativa de 68 isolados de Xcv. Como resultado foi detectado um total de 22 genes distribuídos homogeneamente entre os isolados. Porém, ao analisar as sequências dos genes *xopII* e *xopJ5* nos genomas de Xcv, foram identificadas mutações *frameshift* que resultam em proteínas

truncadas. O método de PCR foi eficiente na detecção dos genes T3Es, no entanto, o método não permite a identificação de polimorfismos. Para tal, é recomendado o sequenciamento pós PCR e posterior análise das sequências para identificação de possíveis variações no conteúdo, incluindo polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs).

Com o objetivo de correlacionar o repertório de genes T3Es com a virulência, 34 isolados de *Xcv*, incluindo o patotipo indiano, foram inoculados em videira. Após análises por agrupamento com as variáveis, severidade dos sintomas e população do patógeno 12 dias após a inoculação, permitiram a separação dos isolados em seis grupos. O patotipo da Índia (NCPPB 2475 = LMG 965), apresentou o menor grau de virulência, junto com mais sete isolados. A hipótese levantada é que o efector *XopAD* possui importante papel na virulência de *Xcv*. No entanto, será necessário o sequenciamento do gene *xopAD* nos demais isolados, e verificar se ocorrem mutações que resultam em proteína truncada, além de estudos funcionais envolvendo esse efector.

A mutação de genes que codificam T3Es ocasionou redução da virulência e/ou do *fitness* em diferentes espécies de *Xanthomonas*, indicando que essas proteínas desempenham um papel essencial na patogenicidade (Metz et al., 2005; Gürlebeck et al., 2006, Kumar & Mondal, 2013; Kumar et al., 2016). Medina et al. (2018) por meio de *knockout* de genes T3Es em *X. axonopodis* pv. *manihotis* demonstraram que os efetores *XopZ1*, *XopX*, *XopAO1* e *AvrBs2* são necessários para a virulência máxima do patógeno em variedades de mandioca (*Manihot esculenta*) suscetíveis.

Em conclusão, os isolados de *Xcv* analisados não apresentaram diferenças no repertório de genes T3Es. A identificação do repertório de genes T3Es e a caracterização da diversidade de virulência em *Xcv*, neste estudo, servirão de base para estudos moleculares de interação planta-patógeno e desenvolvimento de variedades de uva resistentes ao cancro bacteriano tendo como alvo os efetores conservados de *Xcv* e considerando sua diversidade de virulência.

## 5. REFERÊNCIAS

- Alfano, J. R., & Collmer A. (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annual Review of Phytopathology*, *42*, 385-414.
- Banzatto, D.A., & Kronka, S.N. (2006). Experimentação agrícola. Jaboticabal: FUNEP.
- Bart, R., Cohn. M., Kassen, A., McCallum., E. J., Shybut, M., et al. (2012). High-throughput genomic sequencing of cassava bacterial blight strains identifies conserved effectors to target for durable resistance. *PNAS*, *109*, e1972-79.
- da Silva, A. C., Ferro, J. A., Reinach, F. C., Farah, C. S., Furlan, L. R., Quaggio, R. B., Monteiro-Vitorello, et al. (2002). Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, *417*, 459-463.
- Escalon, A., Javegny, S., Vernière, C., Noël, L. D., Vital, K., Poussier, S., & Gagnevin, L. (2013). Variations in type III effector repertoires, pathological phenotypes and host range of *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotypes. *Molecular Plant Pathology*, *14*, 483-496.
- Ferreira, D. F. (2008). SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium*, *6*, 36-41.
- Ferreira, M. A. S. V., Bonneau, S., Briand, M., Cesbron, S., Portier, P., Darrasse, A., Gama, M. A. S., Barbosa, M. A. G., Mariano, R. L. R., Souza, E. B., & Jacques M-A. (2019). *Xanthomonas citri* pv. *viticola* affecting grapevine in Brazil: emergence of a successful monomorphic pathogen. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 489.
- Gama, M. A. S. (2014). Variabilidade de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, agente do cancro bacteriano da videira. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, Brasil.
- Gama, M. A. S., Mariano, R. L. R., Silva Júnior, W. J., Farias, A. R. G., Barbosa, M. A. G., Ferreira, M. A. S. V., Costa Júnior, C. R. L., Santos, L. A., & Souza, E. B. (2018).

- Taxonomic repositioning of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 as *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 comb. nov. and emendation of the description of *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* to include pigmented isolates pathogenic to cashew plant. *Phytopathology*, *108*, 1143-1153.
- Gordon, J. L., Lefeuvre, P., Escalon, A., Barbe, V., Cruveiller, S., Gagnevin, L., & Pruvost, O. (2015). Comparative genomics of 43 strains of *Xanthomonas citri* pv. *citri* reveals the evolutionary events giving rise to pathotypes with different host ranges. *BMC Genomics*, *16*, 1098.
- Gürlebeck, D., Thieme, F., & Bonas, U. (2006). Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *Journal of Plant Physiology*, *163*, 233-255.
- Guy, E., Genissel, A., Hajri, A., Chabannes, M., David, P., Carrere, S., & Poussier, S. (2013). Natural genetic variation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pathogenicity on *Arabidopsis* revealed by association and reverse genetics. *mBio*, *4*, e00538-12.
- Hajri, A., Brin, C., Hunault, G., Lardeux, F., Lemaire, C., Manceau, C., & Poussier, S. (2009). A «repertoire for repertoire» hypothesis: Repertoires of type three effectors are candidate determinants of host specificity in *Xanthomonas*. *PloS one*, *4*, e6632.
- Hajri, A., Brin, C., Zhao, S., David, P., Feng, J. X., Koebnik, R., Szurek, B., Verdier, V., Boureau, T., & Poussier, S. (2012a). Multilocus sequence analysis and type III effector repertoire mining provide new insights into the evolutionary history and virulence of *Xanthomonas oryzae*. *Molecular Plant Pathology*, *13*, 288-302.
- Hajri, A., Pothier, J. F., Fischer-Le Saux, M., Bonneau, S., Poussier, S., Boureau, T., & Manceau, C. (2012b). Type three effector genes distribution and sequence analysis provides new insights into pathogenicity of plant pathogenic *Xanthomonas arboricola*. *Applied and Environmental Microbiology*, *AEM*, 06119.

- Jaciani, F. J., Ferro, J. A., Ferro, M. I. T., Vernière, C., Pruvost, O., & Belasque Júnior, J. (2012). Genetic diversity of a Brazilian strain collection of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* based on the type III effector protein genes. *Plant Disease*, *96*, 193-203.
- Jacques, M. A., Arlat, M., Boulanger, A., Boureau, T., Carrère, S., Cesbron, S., Fischer-Le Saux, M., et al. (2016). Using ecology, physiology, and genomics to understand host specificity in *Xanthomonas*. *Annual Review of Phytopathology*, *54*, 163-187.
- Jiang, B. L., He, Y. Q., Cen, W.J., Wei, H.Y., Jiang, G.F., Jiang, W., & Tang, J. L. (2008). The type III secretion effector XopXccN of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* is required for full virulence. *Research in Microbiology*, *159*, 216-220.
- Jiang, W., Jiang, B. L., Xu, R. Q., Huang, J. D., Wei, H. Y., Jiang, G. F. & Su, L. L. (2009). Identification of six type III effector genes with the PIP box in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and five of them contribute individually to full pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *22*, 1401-1411.
- Kado, C. I., & Heskett, M. G. (1970). Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, *60*, 969-976.
- Kay, S., & Bonas, U. (2009). How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Current Opinion in Microbiology*, *12*, 37-43.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G., & Bonas U. (2007). A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science*, *318*, 648-51.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., & Thierer, T. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, *28*, 1647-1649.
- Kumar, R., & Mondal, K. K. (2013). XopN-T3SS effector modulates in planta growth of *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae* and cell-wall-associated immune response to

- induce bacterial blight in pomegranate. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 84, 36-43.
- Kumar, R., Soni, M., & Mondal, K. K. (2016). XopN-T3SS effector of *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae* localizes to the plasma membrane and modulates ROS accumulation events during blight pathogenesis in pomegranate. *Microbiological Research*, 193, 111-120.
- Lazzarotto, J. J., & Fioravanco J. C. (2013). Tendências e sazonalidades nas exportações e importações brasileiras de uva de mesa. *Informações Econômicas*, 43, 43-58.
- Lima, N. B., Gama M. A. S., Mariano, R. L. R., Silva Júnior. W. J., Farias, A. R. G., Falcão, R. M., Sousa-Paula L. C., Benko-Iseppon, A. M., Paiva Júnior, S. S. L., Balbino, V. Q. & Souza, E. B. (2017). Complete genome sequence of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* strain CCRMXCV 80 from Brazil. *Genome Announcements*, 5, e01263-17.
- MAPA (2018). Instrução Normativa nº 38, de 1º de outubro de 2018. <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=02/10/2018&jornal=515&pagina=14&totalArquivos=104>. Consultado em: 23/06/2018.
- Marques, E. (2007). Variabilidade e tolerância ao cobre em *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, agente causal do cancro bacteriano da videira (*Vitis* spp.). Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. Brasília, Brasil.
- Marques, E., Uesugi, C. H., & Ferreira, M. A. S. V. (2009). Sensitivity to copper in *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Tropical Plant Pathology*, 34, 406-411.
- Medina, C. A., Reyes, P. A., Trujillo, C. A., Gonzalez, J. L., Bejarano, D. A., Montenegro, N. A., et al. (2018). The role of type III effectors from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in virulence and suppression of plant immunity. *Molecular Plant Pathology*, 19, 593-606.

- Metz, M., Dahlbeck, D., Morales, C. Q., Sady, B. A., Clark, E. T., & Staskawicz, B. J. (2005). The conserved *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* effector protein XopX is a virulence factor and suppresses host defense in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Journal*, *41*, 801-814.
- Mondal, K. K., Meena, B. R., Junaid, A., Verma, G., Mani, C., Majumder, D., Khicher, K., & Kumar, Banik, S. (2014). Pathotyping and genetic screening of type III effectors in Indian strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causing bacterial leaf blight of rice. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *86*, 98-106.
- Mokryakova, M. V., Abdeev, I.A., Piruzyan, E. S., Schaad, N.W., & Ignatov, A.N. (2010). Diversity of effector genes in plant pathogenic bacteria of genus *Xanthomonas*. *Microbiology*, *79*, 58-65.
- Peixoto, A. R., Mariano, R. L. R., & Viana, I. O. (2006). Semi-selective medium for isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Ciência Rural*, *36*, 1317-1320.
- Qian, W., Jia, Y., Ren, S. X., He, Y. Q., Feng, J. X., et al. (2005). Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Research*, *15*, 757-767.
- Ranwez, V., Harispe, S., Delsuc, F., & Douzery, E. J. (2011). MACSE: Multiple Alignment of Coding SEquences accounting for frameshifts and stop codons. *PloS one*, *6*, e22594.
- Roux, B., Bolot, S., Guy, E., Denancé, N., Lautier, M., Jardinaud, M. F., & Pruvost, O. (2015). Genomics and transcriptomics of *Xanthomonas campestris* species challenge the concept of core type III effectome. *BMC Genomics*, *16*, 975.
- Rozen, S., & Skaletsky, H. J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. (In: S. Krawetz, & S. Misener (Eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (pp. 365-386). Totowa: Humana Press.)



- Ryan, R. P., Vorhölter, F. J., Potnis, N., Jones, J. B., Van Sluys, M. A., Bogdanove, A. J., & Dow, J. M. (2011). Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions. *Nature Reviews Microbiology*, *9*, 344-355.
- Sinha, D., Gupta, M.K., Patel, H.K., Ranjan, A., & Sonti, R.V. (2013). Cell wall degrading enzyme induced rice innate immune responses are suppressed by the type 3 secretion system effectors XopN, XopQ, XopX and XopZ of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *PloS one*, *8*, e75867.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, *30*, 1312-1313.
- Teper, D., Salomon, D., Sunitha, S., Kim, J. G., Mudgett, M. B., & Sessa, G. (2014). *Xanthomonas euvesicatoria* type III effector XopQ interacts with tomato and pepper 14–3–3 isoforms to suppress effector-triggered immunity. *The Plant Journal*, *77*, 297-309.
- Thieme, F., Koebnik, R., Bekel, T., Berger, C., Boch, J., et al. (2005) Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *Journal Bacteriology*, *187*, 7254-7266.
- Trindade, L. C., Lima, M. F., & Ferreira, M. A. S. V. (2005). Molecular characterization of Brazilian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* by rep-PCR fingerprinting. *Fitopatologia Brasileira*, *30*, 46-54.
- Trujillo, C. A., Ochoa, J. C., Mideros, M. F., Restrepo, S., López, C., & Bernal, A. (2014). A Complex population structure of the cassava pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in recent years in the Caribbean region of Colombia. *Microbial Ecology*, *68*, 155-167.

- Villela, J. G. A., Ritschel, P., Barbosa, M. A. G., Baccin, K. M., Rossato, M., Maia, J. D., & Ferreira, M. A. (2019). Detection of *Xanthomonas citri* pv. *viticola* on grapevine by real-time PCR and BIO-PCR using primers designed from pathogenicity and xanthomonadin gene sequences. *European Journal of Plant Pathology*, 1-15.
- Vorhölter, F. J., Schneiker, S., Goesmann, A., Krause, L., Bekel, T., et al. (2008) The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. *Journal of Biotechnology*, 134, 33-45.

**Tabela 1** Isolados bacterianos utilizados na caracterização do repertório de genes efetores do tipo III em *Xanthomonas citri* pv. *viticola*

Isolado	Hospedeira	Variedade	Origem e data de coleta
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>viticola</i>			
NCPPB 2475 (LMG 965)	<i>Vitis vinifera</i>	Anab-e-Shahi	Andhra Pradesh – Índia, 1972
UnB 1183, UnB 1184, UnB 1188, UnB 1189, UnB 1190, UnB 1193, UnB 1194, UnB 1195	<i>Vitis vinifera</i>	Red Globe	Petrolina – PE, 1998
UnB 1192	<i>Vitis vinifera</i>	Itália	Petrolina – PE, 1998
Emb. A31-1	<i>Vitis vinifera</i>	Nd	Sobradinho – BA, 2000
UnB 1205	<i>Vitis vinifera</i>	Itália	Sobradinho – BA, 2000
UnB 1226	<i>Vitis vinifera</i>	Thompson Seedless	Petrolina – PE, 2001
UnB 1307, UnB 1309, UnB 1313, UnB 1315	<i>Vitis vinifera</i>	Sugraone	Petrolina – PE, 2005
UnB 1316	<i>Vitis vinifera</i>	Red Globe	Juazeiro – BA, 2005
UnB 1318	<i>Vitis vinifera</i>	BRS Morena	nd <sup>1</sup> , 2006
Xcv 2	<i>Vitis vinifera</i>	Crimson	Lagoa Grande – PE, 2008
4779B	<i>Vitis vinifera</i>	Red Globe	Cianorte – PR, 2009 <sup>2</sup>
Xcv 273	<i>Vitis vinifera</i>	Red Globe	Petrolina – PE, 2009
A2, A3	<i>Vitis vinifera</i>	Red Globe	Petrolina – PE, 2010
A11, A12	<i>Vitis vinifera</i>	Thompson Seedless	Petrolina – PE, 2010
AR1, AR2	<i>Vitis vinifera</i>	Red Globe	Petrolina – PE, 2012
AM1, AM2, AM3	<i>Amaranthus</i> sp.	-	Petrolina – PE, 2012
P1S5, P1S6 (CFBP 7764), P1S9, P1S16, P2S1, P2S2, P2S4, P2S6	<i>Vitis vinifera</i>	Red Globe	Petrolina – PE, 2012
RS2, RS8, RS10, RS11	<i>Vitis vinifera</i>	Red Globe	Curaçá – BA, 2012
TR1, TR3	<i>Vitis vinifera</i>	Red Globe	Petrolina – PE, 2012
J30, J116, J117, J121	<i>Vitis</i> spp.	Híbrido	nd
UnB 1429	<i>Vitis vinifera</i>	Red Globe	Petrolina – PE, 2016
Xcv 291	<i>Vitis vinifera</i>	Sugraone	Petrolina – PE, 2016
Xcv 302	<i>Vitis vinifera</i>	Sweet Globe	Petrolina – PE, 2017
Xcv 303	<i>Vitis vinifera</i>	Scarlota	Lagoa Grande – PE, 2017
P10	<i>Vitis vinifera</i>	Crimson	Petrolina – PE, 2018
P14	<i>Vitis vinifera</i>	BRS Linda	Petrolina – PE, 2018
P18	<i>Vitis vinifera</i>	Thompson Seedless	Petrolina – PE, 2018
P20	<i>Vitis vinifera</i>	Sugraone	Petrolina – PE, 2018
P33	<i>Vitis vinifera</i>	BRS Isis	Petrolina – PE, 2018
P77	<i>Vitis vinifera</i>	BRS Linda	Petrolina – PE, 2018
P78	<i>Vitis vinifera</i>	Niágara Rosada	Petrolina – PE, 2018
P80, P84, P84, P99	<i>Vitis</i> spp.	Híbrido	Petrolina – PE, 2018
P97, P114	<i>Vitis vinifera</i>	Red Globe	Petrolina – PE, 2018
P103	<i>Vitis vinifera</i>	BRS Vitoria	Petrolina – PE, 2018
P105	<i>Vitis vinifera</i>	BRS Nubia	Petrolina – PE, 2018
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> UnB 1394	<i>Brassica oleracea</i>	Nd	Vargem Bonita – DF, 2016
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i> UnB 92	<i>Citrus</i> sp.	Nd	nd
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> EH 2009-130	<i>Solanum lycopersicum</i>	Nd	Cafelândia – SP, 2009

<sup>1</sup> nd, informação não disponível; <sup>2</sup> Não é área de ocorrência da doença, isolados provenientes de detecção em material que posteriormente foi destruído.

**Tabela 2** Genomas de diferentes patovares de *Xanthomonas citri* usados neste estudo

Patovar	Isolado	Hospedeira	Origem e ano de coleta	Genoma (Mb)	%CG	Scaffolds	Genes	Proteínas	Nº de acesso NCBI
<i>anacardii</i>	CFBP 2913	<i>Mangifera indica</i>	Brasil, nd <sup>1</sup>	5,20	64,60	1	4607	4120	CP024057
<i>anacardii</i>	TAQ18	<i>Anacardium occidentale</i>	Brasil, 2009	5,18	64,10	194	4643	4186	PESG01000000
<i>anacardii</i>	TAQ13	<i>Anacardium occidentale</i>	Brasil, 2009	5,27	63,90	231	4751	4267	PESH01000000
<i>aurantifolii</i> B	1566	<i>C. aurantifolia</i>	nd <sup>1</sup>	4,96	64,77	-	4499	4027	CP012002
<i>aurantifolii</i> C	FDC 1559	<i>Citrus aurantifolia</i>	Brasil, 1981	5,27	64,65	-	4838	4301	CP011160
<i>aurantifolii</i> B	FDC 1561	<i>Citrus limon</i>	Argentina, 1981	5,03	64,77	-	4591	4099	CP011250
<i>aurantifolii</i> C	FDC 1609	<i>Citrus paradisi x Poncirus trifoliata</i>	Brasil, 2009	5,28	64,73	-	4829	4289	CP011163
<i>azadirachtae</i>	LMG 543	<i>Azadirachta indica</i>	Índia, 1971	5,18	64,50	236	4743	4172	LOKS01000000
<i>bauhiniae</i>	LMG 548	<i>Bauhinia racemosa</i>	Índia, 1961	5,19	64,60	192	4746	4243	LOKR01000000
<i>bilvae</i>	NCPBP 3213	<i>Aegle marmelos</i>	Índia, 1982	4,99	64,60	60	4639	4530	LN678639
<i>cajani</i>	LMG 558	<i>Cajanus cajan</i>	Índia, 1950	5,41	64,50	312	4947	4415	LOKQ01000000
<i>centellae</i>	LMG 9044	<i>Centella asiatica</i>	Índia, 1979	5,15	64,60	315	4721	4187	LOJR01000000
<i>cissicola</i>	LMG 21719	<i>Cayratia japonica</i>	Japão, 1974	5,25	64,5	313	4522	4144	LOJT01000000
<i>citri</i> A	UI7	<i>Citrus</i> sp.	China, 2011	5,22	64,74	-	4727	4396	CP008989
<i>citri</i> A	306	<i>Citrus sinensis</i>	Brasil, 1997	5,27	64,74	-	4787	4418	3919
<i>citri</i> A	NT17	<i>Citrus sinensis</i>	Estados Unidos, 2011	5,27	64,74	-	4758	4418	CP008995
<i>citri</i> A	MN11	<i>Citrus aurantifolia</i>	Estados Unidos, nd <sup>1</sup>	5,22	64,74	-	4722	4392	CP009001
<i>citri</i> A	5208	<i>Citrus</i> sp.	Estados Unidos, 2005	5,27	64,74	-	4756	4417	CP009028
<i>citri</i> A*	JS581	<i>Citrus limetta</i>	Irã, 1997	5,26	64,50	132	4779	4348	LN648636
<i>citri</i> A*	AS270	<i>Citrus aurantifolia</i>	Arábia Saudita, 1988	5,27	64,60	29	4822	4448	JPLN01000000
<i>citri</i> A*	JS582	<i>Citrus sinensis</i>	Irã, 1997	5,34	64,00	191	364	364	LN648296
<i>citri</i> A <sup>w</sup>	AW13	<i>Citrus aurantifolia</i>	Estados Unidos, 2003	5,40	64,66	-	4904	4526	CP009031
<i>citri</i> A <sup>w</sup>	AW16	<i>Citrus limon</i>	Estados Unidos, 2005	5,40	64,66	-	4907	4530	CP009040
<i>citri</i> A <sup>w</sup>	Aw12879	<i>Citrus</i> sp.	Estados Unidos, nd <sup>1</sup>	5,40	64,66	-	4908	4522	20817
<i>clitoriae</i>	LMG 9045	<i>Clitoria</i> sp.	Índia, 1974	5,02	64,70	91	4517	4161	LOKA01000000
<i>dieffenbachiae</i>	LMG 7399	<i>Dieffenbachia</i> sp.	Estados Unidos, 1950	5,13	64,50	204	4565	4141	JPYH02000000
<i>durantae</i>	LMG 696	<i>Duranta repens</i>	Índia, 1957	5,42	64,70	187	5029	4584	LOKP01000000

<sup>1</sup>nd, informação não disponível

**Tabela 2** Genomas de diferentes patovares de *X. citri* usados neste estudo (Continuação)

Patovar	Isolado	Hospedeira	Origem e ano de coleta	Genoma (Mb)	%CG	Scaffolds	Genes	Proteínas	Nº de acesso NCBI
<i>fuscans</i>	CFBP6996R	<i>Phaseolus vulgaris</i> var. Michelet	França, 1998	5,15	64,76	-	4525	4123	CP020989
<i>fuscans</i>	CFBP6165	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Canadá, 1957	5,12	64,76	-	4566	4060	CP020998
<i>fuscans</i>	CFBP6988R	<i>Phaseolus vulgaris</i> var. Marla	França, 2000	5,20	64,65	-	4700	4274	CP020979
<i>fuscans</i>	CFBP6167	<i>Phaseolus</i> sp,	Estados Unidos, 1954	5,39	64,55	-	4884	4327	CP021018
<i>fuscans</i>	CFBP7767	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Camarões, 2009	5,33	64,52	-	4813	3952	CP021012
<i>glycines</i>	CFBP 7119	<i>Glycine max</i>	Brasil, 1981	5,52	64,34	4	5040	4652	CM002264
<i>glycines</i>	CFBP 2526	<i>Glycine hispida</i>	Sudão, 1956	5,25	64,67	4	4779	4400	CM002268
<i>khayae</i>	LMG 753	<i>Khaya senegalensis</i>	Índia, 1957	4,98	64,70	354	4538	3986	LOKN01000000
<i>leeana</i>	LMG 9048	<i>Leea edgeworthii</i>	Índia, 1967	5,00	64,60	92	4484	4088	LOJY01000000
<i>malvacearum</i>	MSCT	<i>Gossypium</i> sp,	nd <sup>1</sup>	5,12	64,64	-	4720	4141	CP017020
<i>malvacearum</i>	LMG 761	<i>Gossypium</i> sp,	Sudão, 1958	5,14	64,50	223	4706	4139	LOKM01000000
<i>mangiferaeindicae</i>	LG56-10	<i>Mangifera indica</i>	China, nd <sup>1</sup>	3,87	68,90	-	3374	3173	PEBY01000000
<i>mangiferaeindicae</i>	LMG 941	<i>Mangifera indica</i>	Índia, 1948	5,11	64,80	195	4627	4188	CAHO01000000
<i>martyniicola</i>	LMG 9049	<i>Martynia diandra</i>	Sudão, 1958	4,92	64,70	76	4422	4072	LOJX01000000
<i>melhusii</i>	LMG 9050	<i>Tectona grandis</i>	Índia, 1961	5,08	64,70	101	4592	4207	LOJW01000000
<i>punicae</i>	LMG 859	<i>Punica granatum</i>	Índia, 1969	4,95	64,90	217	4486	4010	CAGJ01000000
<i>thespesiae</i>	LMG 9057	<i>Thespesia populnea</i>	Índia, 1978	5,00	64,60	93	4478	4084	LOJU01000000
<i>vignicola</i>	CFBP7111	<i>Vigna sinensis</i>	Estados Unidos, 1948	5,71	64,46	-	5208	4772	CP022263
<i>vignicola</i>	CFBP7113	<i>Vigna unguiculata</i>	Sudão, 1966	5,11	64,70	-	4551	4074	CP022270
<i>vignicola</i>	CFBP7112	<i>Vigna sinensis</i>	Estados Unidos, 1942	5,16	64,65	-	4559	4124	CP022267
<i>viticola</i>	CCRMXCV 80	<i>Vitis vinifera</i>	Brasil, 2009	5,37	63,80	150	4916	4490	NWTJ01000000
<i>viticola</i>	CFBP 7764	<i>Vitis vinifera</i>	Brasil, 2012	5,31	64,30	76	4791	4404	PPHE01000000
<i>viticola</i>	LMG 965	<i>Vitis vinifera</i>	Índia, 1972	5,11	64,50	50	4578	4222	CBZT01000000
<i>vitiscarnosae</i>	LMG 939	<i>Cayratia trifolia</i>	Índia, 1962	5,06	64,70	105	4570	4180	LOKI01000000
<i>vitistrifoliae</i>	LMG 940	<i>Cayratia trifolia</i>	Índia, 1961	5,07	64,70	184	4643	4156	LOKH01000000
<i>vitiswoodrowii</i>	LMG 954	<i>Cissus woodrowii</i>	Índia, 1961	5,03	64,60	102	4514	3977	LOKG01000000

<sup>1</sup> nd, informação não disponível

**Tabela 3** Primers utilizados na caracterização do repertório de efetores do tipo III em *Xanthomonas citri* pv. *viticola*

Gene efetor	Forward Primer	Reverse Primer	TA °C	Amplicon (pb)	Isolado de origem	Referência
<i>avrBs2</i>	CAGATCACCGTGCAGACACT	GGTCTGGTCGGTCTTGACAT	60	834	Xac 306	Escalon et al., 2013
<i>avrXccA2</i>	AACGCTATGTGCCGCTCAA	CGCCCTGAATACTAACCTCAT	60	405	Xcc ATCC33913, Xcc 8004, Xcc B100	Mokryakova et al., 2010
<i>hpaA</i>	CTGCGCGGCTTTTCCGCATT	TTGCCGCCCTCGGTTTCGAC	64	717	Xac 306	Escalon et al., 2013
<i>hrpW</i>	GCGGTTGATACAGACCCAAT	CTGCTTCCTTGATGCCTTTC	60	752	Xac 306	Escalon et al., 2013
<i>xopA</i>	TGCATCGATCCGGTGTC	GCCAACTCGTCCTTCTTTCA	60	384	Xac 306	Escalon et al., 2013
<i>xopAD</i>	CAACACCTTCAGCAAGTGGC	AATCCGGAATCGTCGACCAG	68	339	Xcv LMG 965, Xcv CFBP 7764, Xcv CCRMXCV 80	Este estudo
<i>xopAE</i>	GTCCCATTCCTGAGCAGTA	ACGGAACTCTCGCTCAAAAA	60	954	Xac 306	Escalon et al., 2013
<i>xopAI</i>	CGGGTTCACCTGAGCATTAT	GCCAGGAGGGAAGAGAACTT	60	767	Xac 306	Escalon et al., 2013
<i>xopAJ</i>	GACACATCAACAGGCTACTCAG	CGAACTCTTGAATACATCTGG	60	346	Xe 85-10	Mokryakova et al., 2010
<i>xopAK</i>	CAAAGACCCAGAAAGCGTGT	GACCAGGTTGATGGCATTIT	60	615	Xac 306	Escalon et al., 2013
<i>xopB</i>	GCCGACTGTGTTTCTGCCGACC	CGCCGTCTCAACCGTGAAT	60	179	Xe 85-10	Mokryakova et al., 2010
<i>xopC1</i>	GCGAACAACAGAGCTGGCCAGTTC	TTCGCGGACAAAGTTAGAGTATAC	62	1161	Xe 85-10	Escalon et al., 2013
<i>xopC2</i>	ATGAGCCTGTCCGAAAGCGC	TCACACGGGCAGCGGCTTGC	68	648	Xac 306, Xe 85-10	Hajri, et al., 2012
<i>xopD</i>	CCGACTCGCAGGTAGTGACCAT	TCGCCGAGGAATAACCGTC	64	316	Xcc ATCC33913, Xcc 8004, Xcc B100, Xe 85-10	Mokryakova et al., 2010
<i>xopE1</i>	GACAAAACGCTTCAGCCGTG	CGAGACACGGCTGGCCTTG	64	814	Xac 306	Escalon et al., 2013
<i>xopE2</i>	CGGGTTCACCTGAGCATTAT	ATCTTGAAGGATCGCAGCAG	60	987	Xac 306	Escalon et al., 2013
<i>xopE3</i>	TGTCGTAAATGGGCTGTTGA	GCCGATTTGATGGACATCTT	60	985	Xac 306	Escalon et al., 2013
<i>xopF2</i>	TGAACGCCTGTCTCGCTAA	CGGACGCTGCCTACGAA	60	825	Xac 306	Mokryakova et al., 2010
<i>xopI1</i>	ATGACCCGAGCTTGGAGTTC	GTCGCAAGCATCATGCTGGCCGTGGC	68	1045	Xac 306, Xe 85-10	Hajri, et al., 2012
<i>xopJ5</i>	GTCATCGTTATCCGCCATC	CGTGGCAAGGTGTCCGTCT	60	192	Xcc ATCC33913, Xcc 8004, Xcc B100	Mokryakova et al., 2010
<i>xopK</i>	TTCGTGGTCGCCAAGTA	ACGACAAAGCCCTTGTTC	58	1052	Xac 306	Escalon et al., 2013
<i>xopL</i>	AATGGCAACGCCACTACAG	TTACTGATCGCGTGAAGGTG	60	1421	Xac 306	Escalon et al., 2013
<i>xopN</i>	ACTACGCAGCTGATCCAGT	CTCTTGACCGCCTTATCTC	60	879	Xac 306	Escalon et al., 2013
<i>xopP</i>	ATCTATGGCCAACGATGCTC	ATGTACGTGGACGAACCAG	60	797	Xac 306	Escalon et al., 2013
<i>xopQ</i>	GCGGATCGTAGAGATTGAGC	CGATGTCGTGACCTACACCA	60	836	Xac 306	Escalon et al., 2013
<i>xopR</i>	TGCATCTTGGTCATGTCGAT	ATGCGCTTGACTTCGTTCTT	60	962	Xac 306	Escalon et al., 2013

**Tabela 3** *Primers* utilizados na caracterização do repertório de efetores do tipo III em *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Continuação)

<b>Efetores</b>	<b>Forward Primer</b>	<b>Reverse Primer</b>	<b>TA °C</b>	<b>Amplicon (pb)</b>	<b>Isolado de origem</b>	<b>Referência</b>
<i>xopV</i>	GGGTCTTGTTCCATGGTTG	CGAAGCGCATCAGCCAAG	60	562	Xac 306	Escalon et al., 2013
<i>xopX</i>	GAGGATGAGGCTTCGATCAG	GTTTCTCACCACCGAAGT	60	788	Xe 85-10	Escalon et al., 2013
<i>xopZ1</i>	GATCGCTCGGTGGAGATTTA	ATAGCTGCCAGTTGCGTTTC	60	858	Xac 306	Escalon et al., 2013

Xac = *Xanthomonas citri* pv. *citri*; Xcv = *X. citri* pv. *viticola*; Xcc = *X. campestris* pv. *campestris*; Xe = *X. euvesicatoria*. TA = temperatura de anelamento dos *primers*.

**Tabela 4** Repertório de genes efetores tipo III (T3Es) nos genomas de 53 isolados de *Xanthomonas citri*. A presença de um gene efetor T3Es é indicada pelo número 1 e sua ausência pelo número 0. Os genes efetores com sequências incompletas ou mutações *frameshift* resultando em produto gênico truncado são indicados pelo símbolo Ψ

Isolado	<i>hpaA</i>	<i>xopA</i>	<i>Qtox</i>	<i>xopX</i>	<i>TZtoxA</i>	<i>ZYtoxA</i>	<i>xtoxA</i>	<i>avrBs2</i>	<i>xopEI</i>	<i>xopAK</i>	<i>xopAU</i>	<i>XopA</i>	<i>xopAV</i>	<i>xopE3</i>	<i>xopA</i>	<i>xopAY</i>	<i>xopP</i>	<i>xopR</i>	<i>xopS</i>	<i>xopAD</i>	<i>xopAE</i>	<i>xopAW</i>	<i>IltoxA</i>	<i>xotoxA</i>	<i>StoxA</i>	<i>xopAI</i>	<i>xopAP</i>	<i>xopC2</i>	<i>hpaW</i>	<i>xopF2</i>	<i>xopE2</i>	<i>XopM5</i>	<i>xopAG</i>	<i>XopB</i>	<i>xopAM</i>	<i>xopCI</i>	<i>xopGI</i>	<i>xopFI</i>	<i>avrXccA1</i>	<i>xopHI</i>	<i>xopLI</i>	<i>xopO</i>	<i>xopAH</i>	<i>avrBsI</i>				
anac CFBP 2913	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	Ψ	1	Ψ	1	0	1	Ψ	0	1	Ψ	Ψ	Ψ	Ψ	0	1	Ψ	1	1	0	0	Ψ	0	0	0	0	0	0				
anac TAQ13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	1	1	0	1	Ψ	0	Ψ	Ψ	Ψ	Ψ	Ψ	Ψ	0	1	Ψ	1	1	0	0	Ψ	0	0	0	0	0	0				
anac TAQ18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	1	1	0	1	Ψ	0	1	Ψ	Ψ	Ψ	Ψ	Ψ	0	1	Ψ	1	1	0	0	Ψ	0	0	0	0	0	0				
aur B 1566	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	1	Ψ	1	1	0	1	Ψ	0	1	Ψ	Ψ	Ψ	Ψ	0	1	0	Ψ	0	0	0	0	Ψ	0	0	0	0	0	0				
aur B FDC 1561	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	1	Ψ	1	1	0	1	0	1	0	1	Ψ	Ψ	Ψ	Ψ	0	1	0	Ψ	0	0	0	0	Ψ	0	0	0	0	0	0			
aur C FDC 1559	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	0	Ψ	1	1	0	0	Ψ	1	0	1	Ψ	0	Ψ	Ψ	0	1	Ψ	1	0	0	0	0	Ψ	0	0	0	0	0	0			
aur C FDC 1609	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	Ψ	Ψ	Ψ	1	0	0	Ψ	Ψ	0	1	Ψ	Ψ	Ψ	Ψ	0	1	Ψ	1	0	0	0	0	Ψ	0	0	0	0	0	0			
azad LMG 543	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	1	1	Ψ	1	Ψ	Ψ	Ψ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	Ψ	0	0	0	0	0	0			
bauh LMG 548	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	Ψ	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	1	1	Ψ	0	1	0	1	1	1	1	0	0	Ψ	0	1	0	0	0	0	Ψ		
bilv NCPPB 3213	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	1	Ψ	1	1	Ψ	1	1	1	0	1	Ψ	0	0	0	0	0	0	0	
caj LMG 558	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	1	Ψ	1	Ψ	1	1	Ψ	Ψ	0	0	1	Ψ	0	0	0	1	0	0	0	
cent LMG 9044	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	Ψ	1	1	1	Ψ	Ψ	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	Ψ	0	0	0	0	0	0	0	0		
cissi LMG 21719	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	Ψ	1	1	Ψ	1	1	Ψ	1	0	Ψ	Ψ	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	Ψ	0	0	0	0	0		
cit A 306	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
cit A 5208	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
cit A MN11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
cit A NT17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
cit A UI7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
cit A* AS270	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	1	1	1	Ψ	0	0	0	0	1	0	Ψ	0	0	0	0	0	0	0	0		
cit A* JS581	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	Ψ	0	0	0	0	0	0	0	0		
cit A* JS582	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	1	1	1	Ψ	Ψ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	Ψ	0	0	0	0	0	0	0	0		
cit Aw Aw12879	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
cit Aw AW13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
cit Aw AW16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
elite LMG 9045	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	1	Ψ	1	1	1	1	Ψ	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
dief LMG 7399	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	Ψ	1	1	Ψ	Ψ	0	0	1	1	0	Ψ	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
dur LMG 696	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
fusc CFBP 6165	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	Ψ	Ψ	0	Ψ	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
fusc CFBP 6167	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	Ψ	Ψ	0	Ψ	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
fusc CFBP 6988R	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	Ψ	1	Ψ	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	Ψ	0	0	0	0	0	0	0	0
fusc CFBP 6996R	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	0	1	1	Ψ	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	Ψ	Ψ	0	Ψ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
fusc CFBP 7767	1	1	1	Ψ	Ψ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	1	1	1	Ψ	1	0	1	1	0	0	Ψ	1	0	Ψ	0	1	0	0	Ψ	Ψ	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
gly CFBP 2526	1	1	1	1	1	Ψ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	1	1	1	Ψ	1	Ψ	Ψ	0	Ψ	0	1	0	0	0	0	Ψ	Ψ	Ψ	0	0	0	0	0	0	0		
gly CFBP 7119	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	Ψ	Ψ	0	1	0	0	0	0	1	Ψ	Ψ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
khay LMG 753	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	1	1	1	Ψ	1	1	1	Ψ	Ψ	1	0	Ψ	Ψ	0	Ψ	1	Ψ	1	Ψ	Ψ	0	0	Ψ	0	0	0	0	0	0	0	0	
lee LMG 9048	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	Ψ	1	0	1	Ψ	1	1	Ψ	1	Ψ	0	Ψ	Ψ	Ψ	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
malv LMG761	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	Ψ	1	Ψ	Ψ	0	1	1	Ψ	Ψ	0	Ψ	Ψ	0	Ψ	Ψ	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
malv MSCT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	Ψ	1	0	1	1	Ψ	1	0	1	1	Ψ	1	Ψ	1	Ψ	0	Ψ	0	0	1	0	0	1	0	0	Ψ	1	0	0	1	0	0	0		



**Tabela 4** Repertório de genes efetores tipo III (T3Es) nos genomas de 53 isolados de *Xanthomonas citri*. A presença de um gene efetor T3Es é indicada pelo número 1 e sua ausência pelo número 0. Os genes efetores com sequências incompletas ou mutações *frameshift* resultando em produto gênico truncado são indicados pelo símbolo Ψ.

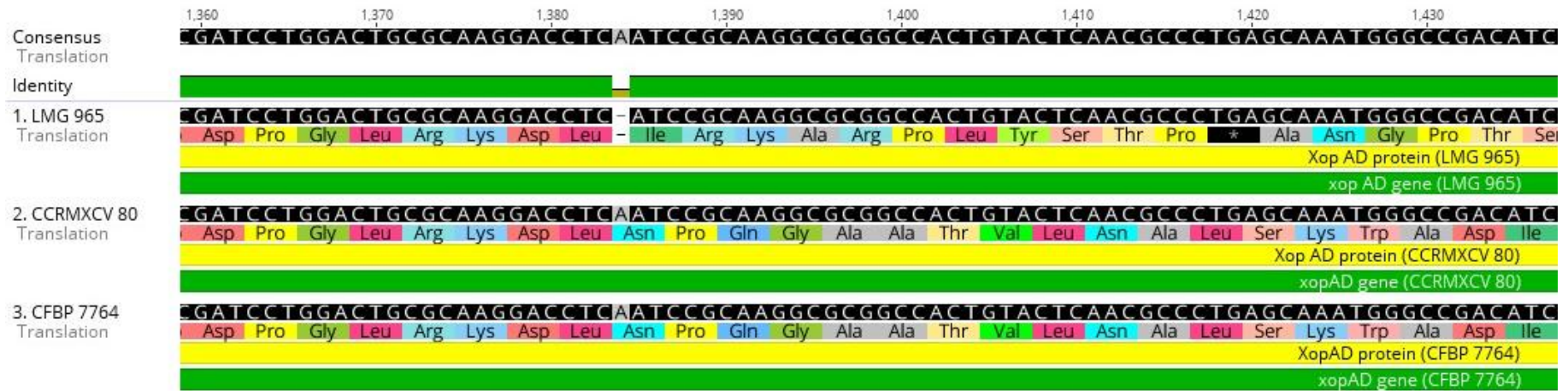
Isolado	<i>hpaA</i>	<i>xopa</i>	<i>xodx</i>	<i>xofx</i>	<i>xodx1</i>	<i>xodx2</i>	<i>xodx3</i>	<i>avrBs2</i>	<i>xopE1</i>	<i>xopAK</i>	<i>xopAU</i>	<i>xopK</i>	<i>xopAV</i>	<i>xopE3</i>	<i>xodx</i>	<i>xodxY</i>	<i>xopP</i>	<i>xopX</i>	<i>xopA</i>	<i>xopAD</i>	<i>xopAE</i>	<i>xopAW</i>	<i>lhdax</i>	<i>xodx</i>	<i>sdax</i>	<i>xopAI</i>	<i>xopAP</i>	<i>xopC2</i>	<i>hpaW</i>	<i>xopF2</i>	<i>xopE2</i>	<i>XopM5</i>	<i>xopAG</i>	<i>XopB</i>	<i>xopAM</i>	<i>xopCI</i>	<i>xopGI</i>	<i>xopFI</i>	<i>avrXccA1</i>	<i>xopHI</i>	<i>lhdI</i>	<i>xop</i>	<i>xopAH</i>	<i>avrBs1</i>		
mang LG56-10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	Ψ	1	1	1	Ψ	0	1	0	0	Ψ	1	0	0	0	0	Ψ	0	Ψ	0	0	0	0	0	0	0	
mang LMG 941	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	Ψ	1	1	1	Ψ	1	1	0	0	Ψ	1	Ψ	0	0	0	1	Ψ	Ψ	0	0	0	0	0	0	0	
mart LMG 9049	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	Ψ	1	1	Ψ	1	1	Ψ	0	Ψ	0	1	0	0	0	Ψ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
mel LMG 9050	1	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	Ψ	Ψ	0	1	1	Ψ	Ψ	1	1	Ψ	0	Ψ	Ψ	Ψ	0	0	0	0	0	Ψ	0	0	0	0	0	0	0	
pun LMG 859	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	Ψ	1	1	1	1	1	1	0	1	Ψ	1	1	1	1	1	0	1	0	0	Ψ	1	0	0	0	1	0	0		
the LMG 9057	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	Ψ	0	1	1	0	1	1	Ψ	1	0	1	1	1	1	Ψ	1	0	1	0	0	0	0	Ψ	1	0	0	0	Ψ	1	0	0	0	0	0	0	
vig CFBP 7111	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	0	1	1	1	1	1	0	Ψ	0	Ψ	Ψ	0	0	Ψ	Ψ	0	Ψ	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	Ψ	Ψ	
vig CFBP 7112	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	Ψ	1	1	1	Ψ	0	1	Ψ	1	1	1	1	1	0	Ψ	1	0	0	Ψ	1	1	Ψ	1	1	1	0	1	0	1	1	0	Ψ	0	0	0	0	0	
vig CFBP 7113	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	Ψ	1	0	0	Ψ	Ψ	Ψ	0	1	1	0	1	0	0	Ψ	0	0	0	0	0	0	0	0		
vit CCRMXCV 80	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	Ψ	0	1	0	0	0	Ψ	0	0	0	Ψ	0	0	0	0	0	0	0
vit CFBP 7764	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	Ψ	0	Ψ	0	Ψ	0	1	0	0	0	Ψ	0	0	0	0	0	0	0
vit LMG 965	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	1	Ψ	1	1	1	Ψ	1	0	Ψ	0	Ψ	0	Ψ	0	1	0	0	0	Ψ	0	0	0	0	0	0
vitisc LMG 939	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	Ψ	0	1	0	0	0	Ψ	0	0	0	Ψ	0	0	0	0	0	0	0
vitist LMG 940	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	1	1	1	1	Ψ	1	1	Ψ	1	1	Ψ	1	1	1	Ψ	Ψ	1	1	Ψ	Ψ	0	1	0	1	Ψ	1	0	1	1	Ψ	0	0	0	0	0	0	0	
vitisw LMG 954	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Ψ	1	1	1	1	1	Ψ	1	1	Ψ	Ψ	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	Ψ	0	0	0	Ψ	0	0	0	

Abreviações dos patovares : anac, *anacardii*; aur B, *aurantifolii* patótipo B; aur C, *aurantifolii* patótipo C; azad, *azadirachtae*; bauh, *bauhiniae*, bilv, *bilvae*; caj, *cajani*; cent, *centellae*; cissi, *cissicola*; cit A, *citri* patótipo A; cit A\*, *citri* patótipo A\*; cit A<sup>W</sup>, *citri* patótipo A<sup>W</sup>; clit, *clitoriae*; dief, *dieffenbachiae*; dur, *durante*; fusc, *fuscans*; gly, *glycines*; khay, *khayae*, lee, *leana*; malv, *malvacearum*, mang, *mangiferaeindicae*; mart, *martyniicola*; melh, *melhusii*; pun, *punicae*; thes, *thespesiae*, vig, *vignicola*, vit, *viticola*; vitisc, *vitiscarnosae*; vitist, *vitistrifoliae*; vitisw, *vitiswoodrowii*.

**Tabela 5** Severidade de sintomas e população de isolados de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* em folhas de videira (*Vitis vinifera* var. Sagraone) 12 dias após a inoculação

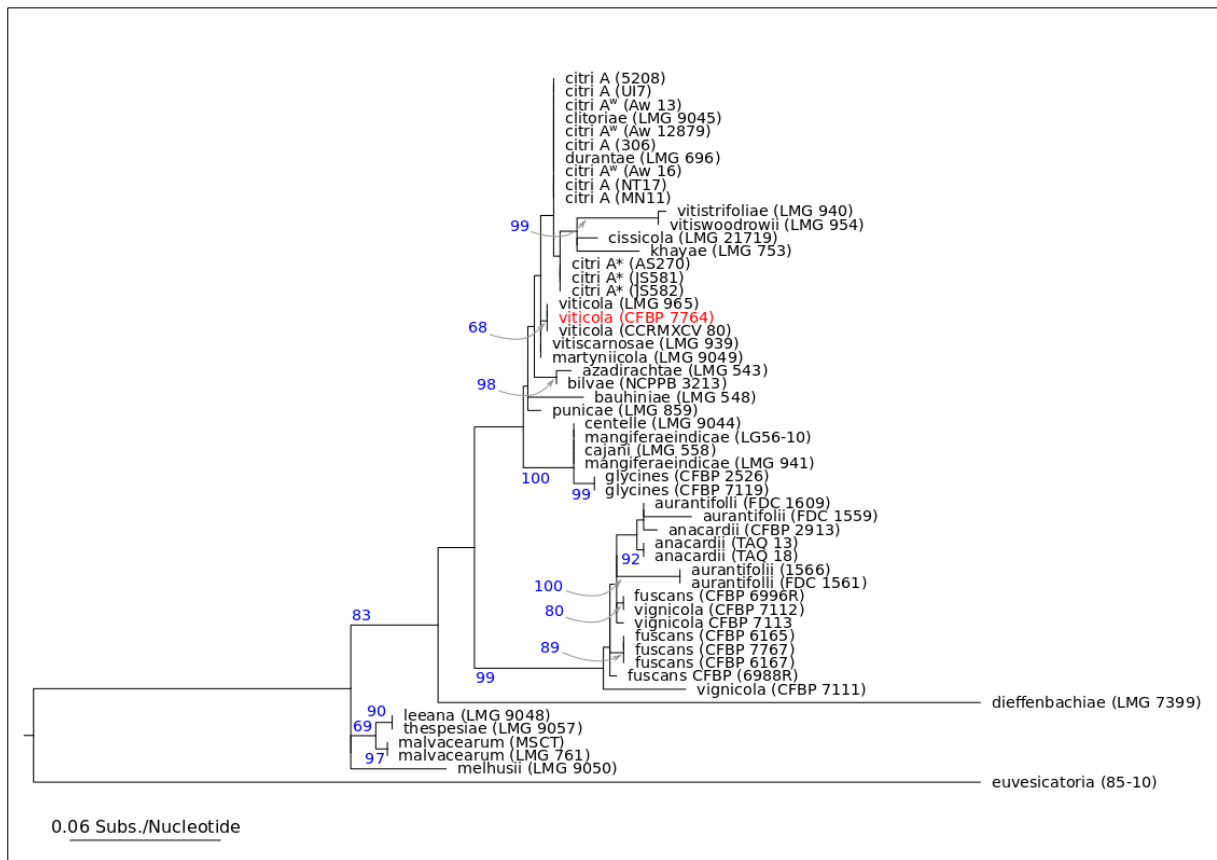
Isolado	Severidade	log UFC/cm <sup>2</sup>
P33	0,88 f	4,56 f
Xcv 302	0,94 f	4,53 f
NCPB 2475 (LMG 965)	0,94 f	4,53 f
Xcv 273	0,97 f	4,53 f
Xcv 303	0,97 f	4,52 f
P14	1,00 f	4,55 f
P18	1,00 f	4,50 f
UnB 1307	1,00 f	4,52 f
UnB 1205	2,13 e	5,12 e
Xcv 2	2,16 e	5,18 e
P84	2,28 e	5,14 e
P80	2,31 e	5,19 e
A2	2,38 e	5,12 e
UnB 1316	2,41 e	5,15 e
UnB 1226	2,53 d	5,62 d
4779 B	2,69 d	5,68 d
P78	2,72 d	5,61 d
UnB 1190	2,81 d	5,63 d
P1S6 (CFBP 7764)	2,94 c	5,85 c
P97	2,94 c	5,87 c
UnB 1192	2,97 c	5,87 c
P10	3,06 c	5,87 c
RS2	3,06 c	5,89 c
UnB 1315	3,09 c	5,91 c
AR1	3,13 c	5,92 c
J30	3,16 c	5,90 c
UnB 1318	3,19 c	5,90 c
P85	3,19 c	5,88 c
TR1	3,22 c	5,93 c
AM1	3,41 b	6,17 b
Xcv 291	3,47 b	6,17 b
P77	3,50 b	6,24 b
P20	3,84 a	6,68 a
UnB 1429	3,97 a	6,70 a
CV (%)	13,59	2,37

Os resultados representam a média de dois ensaios independentes. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

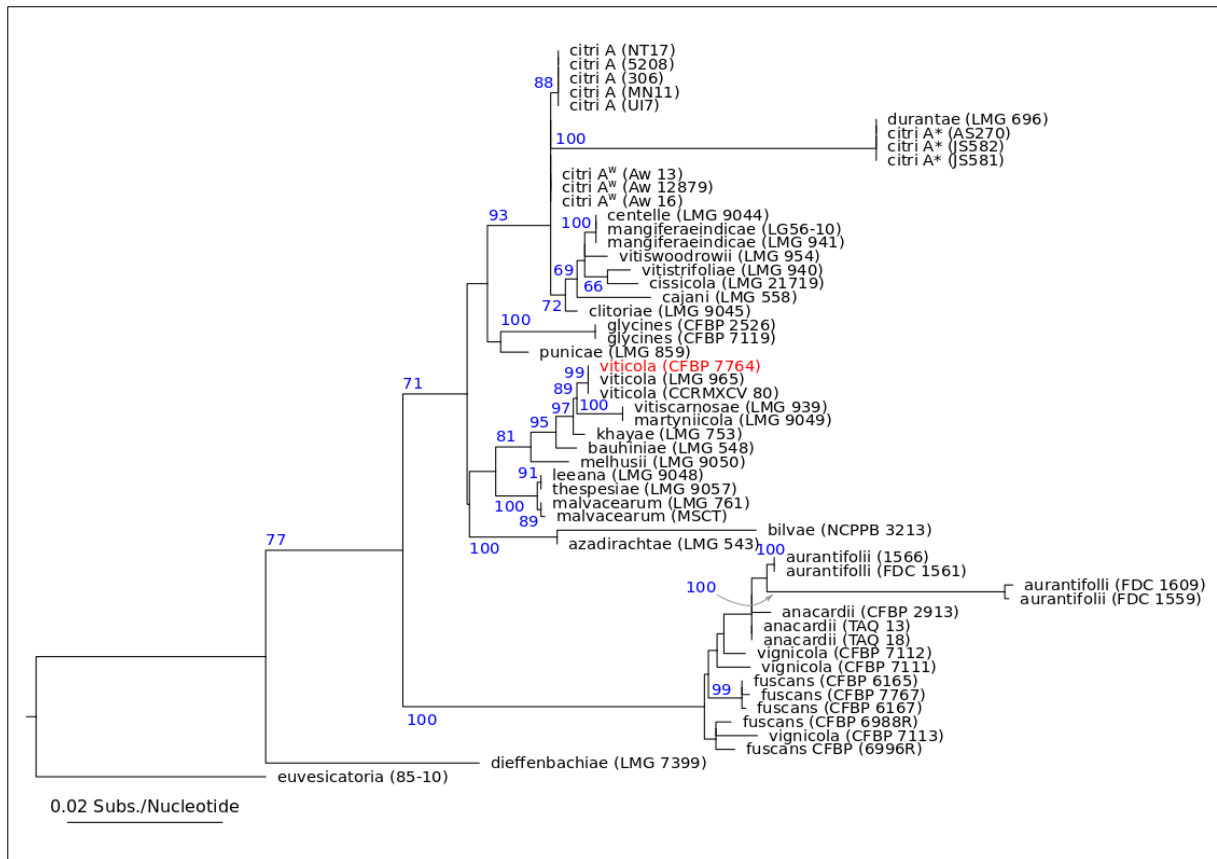


**Figura 1.** Sequências parciais do gene efetor do tipo III (T3Es) *xopAD* de três isolados de *Xanthomonas citri* pv. *viticola*, o patotipo indiano (LMG 965) e dois brasileiros (CCRMXCV 80 e CFBP 7764). A localização da deleção de um nucleotídeo na posição 1384 na sequência do patotipo indiano está indicada pelo símbolo (-). Esta deleção resulta em uma proteína truncada. A posição prematura do códon de parada está indicada por um asterisco.

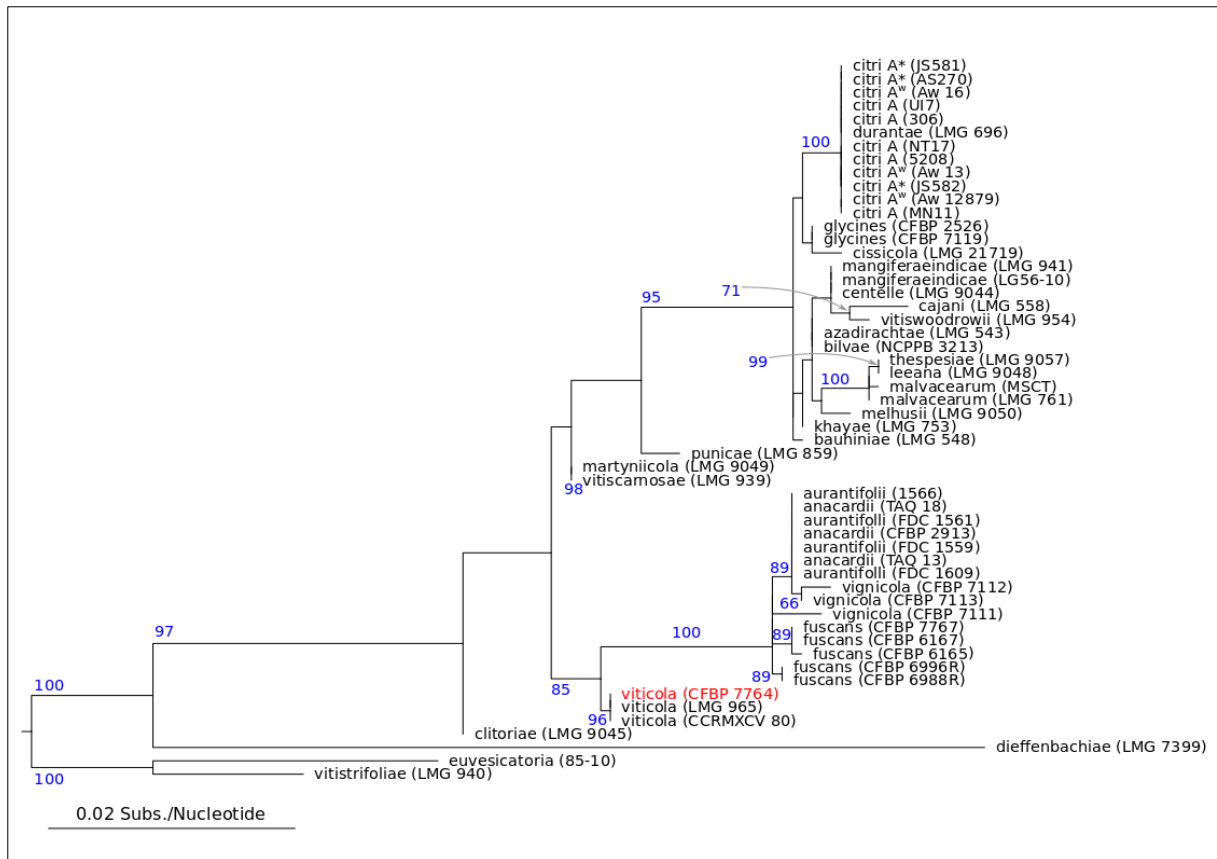




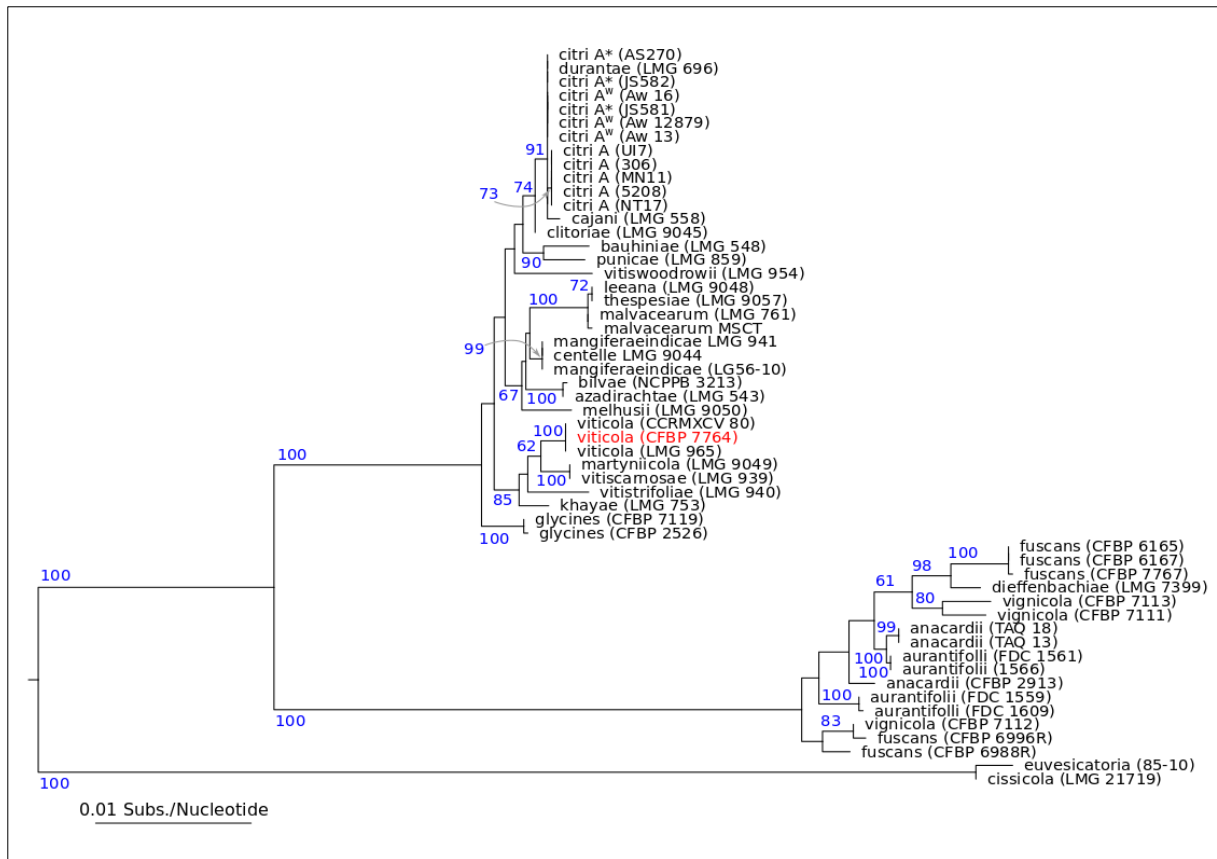
**Figura 3.** Filogenia de isolados de *Xanthomonas citri* pertencentes a diferentes patovares com base nas sequências do gene efetor do tipo III, *xopA*. A árvore filogenética foi construída usando o método de Máxima Verossimilhança. A confiança dos nós foi testada com 1.000 réplicas de *bootstrap*. Valores de *bootstrap* abaixo de 50 % não são mostrados. A escala representa o número de substituições por site. A árvore está enraizada na sequência do gene *xopA* do isolado 85-10 de *X. euvesicatoria*.



**Figura 4.** Filogenia de isolados de *Xanthomonas citri* pertencentes a diferentes patovares com base nas sequências do gene efetor do tipo III, *xopN*. A árvore filogenética foi construída usando o método de Máxima Verossimilhança. A confiança dos nós foi testada com 1.000 réplicas de *bootstrap*. Valores de *bootstrap* abaixo de 50 % não são mostrados. A escala representa o número de substituições por site. A árvore está enraizada na sequência do gene *xopN* do isolado 85-10 de *X. euvesicatoria*.



**Figura 5.** Filogenia de isolados de *Xanthomonas citri* pertencentes a diferentes patovares com base nas seqüências do gene efetor do tipo III, *xopQ*. A árvore filogenética foi construída usando o método de Máxima Verossimilhança. A confiança dos nós foi testada com 1.000 réplicas de *bootstrap*. Valores de *bootstrap* abaixo de 50 % não são mostrados. A escala representa o número de substituições por site. A árvore está enraizada na seqüência do gene *xopQ* do isolado 85-10 de *X. euvesicatoria*.



**Figura 6.** Filogenia de isolados de *Xanthomonas citri* pertencentes a diferentes patovares com base nas sequências do gene efetor do tipo III, *xopZ1*. A árvore filogenética foi construída usando o método de Máxima Verossimilhança. A confiança dos nós foi testada com 1.000 réplicas de *bootstrap*. Valores de *bootstrap* abaixo de 50 % não são mostrados. A escala representa o número de substituições por site. A árvore está enraizada na sequência do gene *xopZ1* do isolado 85-10 de *X. euvesicatoria*.



# CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

---

- Os protocolos de diagnóstico molecular baseados em PCR em tempo real (qPCR) e PCR convencional (cPCR) desenvolvidos neste estudo foram eficientes para detecção de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Xcv) em amostras assintomáticas de videira e *Amaranthus* sp. Os protocolos desenvolvidos poderão ser incluídos em programas de quarentena e certificação de mudas e/ou material de propagação de videira e em estudos epidemiológicos, contribuindo para evitar a disseminação do patógeno em áreas livres do cancro bacteriano. Os pares de *primers* Xpig, desenhados com base na sequência parcial do *cluster* da xantomonadina de Xcv (LMG 965) foram altamente específicos, no entanto, apresentam limitações em qPCR. Para uma detecção específica de Xcv por esse método, novos *primers* devem ser desenhados.
- *Xanthomonas citri* pv. *viticola* apresentou capacidade de colonizar folhas e translocar no sistema vascular de *Senna obtusifolia*, assim como em espécies da família Amaranthaceae (*A. cruentus*, *A. spinosus*, *Chenopodium giganteum* e *C. giganteum*). O patógeno também foi capaz de sobreviver epifiticamente em folhas de *S. obtusifolia* até 20 dias após inoculação. Apesar dos ensaios realizados demonstrarem a capacidade de Xcv infectar plantas das cinco espécies avaliadas, aspectos importantes dessa interação ainda são desconhecidos, tais como: quais tecidos são colonizados, se há formação de biofilme e quais são as etapas dos processos de colonização, translocação e sobrevivência. A obtenção de um isolado de Xcv virulento, transformado e expressando constitutivamente a proteína verde fluorescente (GFP), associada à técnica de microscopia confocal de fluorescência por varredura a laser, poderá fornecer um quadro mais detalhado do processo infeccioso por meio de imagens tridimensionais.

- Isolados de *Xcv* analisados não apresentaram variação no repertório de genes efetores do tipo III. O patotipo de *Xcv* (LMG 965) possui uma deleção de um nucleotídeo no gene *xopAD*, ocasionado a tradução de uma proteína truncada. Elevada diversidade de virulência em videira foi detectada entre os isolados de *Xcv* avaliados. O patotipo apresentou o menor nível de virulência, junto com seis isolados brasileiros. A hipótese levantada é que o efector XopAD possui importante papel na virulência do patógeno. Para confirmação dessa hipótese, seria necessário o sequenciamento do gene desse efector nos demais isolados e verificar se também ocorrem mutações que resultam na tradução de proteína truncada. Estudos adicionais, com o intuito de desvendar a função do efector XopAD no processo de infecção de *Xcv* em videira, também devem ser realizados.