



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

**Determinação do estado de células viáveis e não
cultiváveis e caracterização fisiopatológica de
isolados de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* sob
estresse térmico**

Fernanda de Pádua Del Corona

FERNANDA DE PÁDUA DEL CORONA

**DETERMINAÇÃO DO ESTADO DE CÉLULAS
VIÁVEIS E NÃO CULTIVÁVEIS E
CARACTERIZAÇÃO FISIOPATOLÓGICA DE
ISOLADOS DE *Xanthomonas citri* pv *viticola* SOB
ESTRESSE TÉRMICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama

Coorientadoras: Prof^a. Dr^a. Flávia Figueira Aburjaile

Prof^a. Dr^a. Elineide Barbosa de Sousa

RECIFE – PE

JULHO - 2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C822d Corona, Fernanda de Pádua Del
Determinação do estado de células viáveis e não cultiváveis e caracterização fisiopatológica de isolados de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* sob estresse térmico / Fernanda de Pádua Del Corona. - 2022.
55 f. : il.
- Orientador: Marco Aurelio Siqueira da Gama.
Coorientadora: Flavia Figueira .
Inclui referências.
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, 2022.
1. VBNC. 2. qPCR. 3. Biofilme. 4. Motilidade swarming. I. Gama, Marco Aurelio Siqueira da, orient. II. , Flavia Figueira, coorient. III. Título

**DETERMINAÇÃO DO ESTADO DE CÉLULAS VIÁVEIS E
NÃO CULTIVÁVEIS E CARACTERIZAÇÃO
FISIOPATOLÓGICA DE ISOLADOS DE *Xanthomonas citri*
pv viticola SOB ESTRESSE TÉRMICO**

FERNANDA DE PÁDUA DEL CORONA

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 29/07/2022

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama (UFRPE)

EXAMINADORES:

Dr. Willams Oliveira (EECAC/UFRPE)

Prof. Dr. Sami Michereff (UFCA)

RECIFE-PE

JULHO-2022

*Aos meus pais, **Arminda e Nelson Del Corona**, e ao meu irmão **Rafael**, pelo amor, força e apoio incondicionais.*

DEDICO

“I never lose. I either win or learn.”

Nelson Mandela

AGRADECIMENTOS

À Deus, agradeço por todas oportunidades, caminhos e lições;

Minha eterna gratidão a minha mãe, minha melhor amiga, Arminda Rezende de Pádua Del Corona, pelo amor e apoio incondicionais. Ao meu pai, Nelson Antônio Caleffi Del Corona e meu irmão Rafael de Pádua Del Corona, pela atenção, amor, e apoio em todos os momentos;

Aos meus orientadores Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama e Profa. Dra. Flávia Aburjaile pelos ensinamentos, paciência, e orientação essenciais para a minha formação profissional. À Profa. Dra. Elineide Barbosa de Sousa, pela orientação e conselhos para a realização dos trabalhos;

Agradeço à Profa. Dra. Ana Maria Benko-Iseppon, Dr. José Ribamar Costa Ferreira Neto e Dr. Manasses Daniel da Silva pela estrutura e suporte para a realização deste trabalho;

Aos integrantes do Laboratório de Fitobacteriologia, por toda ajuda e apoio, os quais tornaram essa jornada um pouco mais leve: Keyla Lopes, Fernanda Larisse, Lucas Lucena, Greecy Albuquerque, Igor Alessander, Lucas Amâncio, Messias, Rodrigo, Taciana, Marcelo, David, Lucas Nascimento, e Stefany;

Aos meus amigos, minha gratidão pelo apoio, risadas, conselhos e ombro amigo quando eu mais precisei: Iwanne L. Coelho, Rafaella Moreno, Keyla W. Lopes, Fernanda Larisse dos Santos, Duda Magalhães, Rafael Costa e Karla Ribeiro;

Agradeço minhas tias de coração Zuleide Durey e Rosa Neide Tomazini pela atenção e assistência durante toda jornada em Recife, assim como Denise Durey, campo-grandense de coração recifense, pelo apoio e amizade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, imprescindível para a realização deste trabalho;

Agradeço à Universidade Federal Rural de Pernambuco, ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia e os professores pela oportunidade e conhecimentos adquiridos nesta jornada.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
CAPÍTULO I.....	10
INTRODUÇÃO GERAL	11
1. A cultura da videira	11
2. Doenças da videira	12
3. Cancro bacteriano da videira	13
4. Características do gênero <i>Xanthomonas</i>	14
5. Células viáveis e não cultiváveis (VBNC).....	15
6. Formação de biofilmes e motilidade de <i>X. citri</i> pv. <i>viticola</i>	16
7. Influência de temperaturas elevadas na fisiologia, patogenicidade e virulência de fitobactérias	18
Referências bibliográficas	20
CAPÍTULO II.....	25
Determination of VBNC state and physio-pathological characterization of <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>viticola</i> under temperature stress.....	26
Introduction	28
Material and methods	29
Results.....	34
Discussion	37
References	40
CAPÍTULO III	54
CONCLUSÕES GERAIS.....	55

RESUMO

A região Nordeste destaca-se como a maior produtora de uvas finas de mesa, correspondendo a 99% das exportações brasileira da fruta. Nesta região, o cancro bacteriano da videira, causado por *Xanthomonas citri* pv. *viticola*, é uma das principais fitobacterioses que ameaçam esta cultura. Para alcançar um manejo efetivo da doença, é fundamental compreender os mecanismos de patogênese da bactéria, a interação planta-patógeno e como o ambiente afeta o patógeno e a doença. Nesse contexto, o entendimento da dinâmica de crescimento bacteriano e da influência da temperatura no comportamento fisiopatológico das bactérias se torna essencial para evitar a disseminação do patógeno e criar de estratégias eficientes de manejo da doença. Assim, o presente trabalho avaliou a capacidade de formação de células viáveis, mas não cultiváveis (VBNC) e o comportamento fisiopatológico de *X. citri* pv. *viticola* sob estresse térmico. Os isolados CCRMXCV17, CCRMXCV80 e CCRMXCV117 tiveram suas curvas de crescimento determinadas, sendo a fase logarítmica observada às 96 h para todos os isolados, enquanto foi observada fase de morte às 480 h para o isolado CCRMXCV17 e 288 h para os outros dois isolados. Com a análise de qPCR, foi confirmado a ocorrência do estado de VBNC a partir das 480 h para o isolado CCRMXCV17 e 288 h para CCRMXCV80 e CCRMXCV117. O período de incubação (PI) e a severidade final (SF) da inoculação artificial dos isolados nas fases logarítmica e VBNC, não obtiveram interação significativa ($P>0.05$) entre os fatores fase e isolado, entretanto houve diferença significativa no PI entre as médias do fator isolado. Todos os isolados ressuscitaram após a inoculação na fase de VBNC em meio NYD. No entanto, apenas o isolado CCRMXCV117 apresentou diferença significativa entre as concentrações das fases exponencial e VBNC. Os isolados foram cultivados nas temperaturas 29, 33, 37, 41 e 45 °C e inoculados em mudas de videira para determinação dos componentes epidemiológicos do cancro bacteriano e avaliados quanto a formação de biofilmes *in vitro* e influência da motilidade *swarming*. A inoculação dos isolados cultivados sob estresse térmico apresentou interação significativa entre os fatores isolados e as temperaturas somente para o parâmetro SF. Foi observada fraca formação da matriz de biofilme em todos os isolados, com interação significativa entre os fatores temperatura e isolado. A motilidade *swarming* sob estresse térmico não foi detectada nos três isolados pois o crescimento da colônia restringiu-se ao centro da placa, entretanto houve diferença significativa entre as médias dos fatores avaliados individualmente. Este é o primeiro relato da ocorrência da condição de VBNC em isolados de *X. citri* pv. *viticola*, bem como da capacidade patogênica nesta fase. Desta forma, ressalta-se a importância da aplicação de um conjunto de técnicas para a detecção mais precisa desta doença, bem como a pesquisa contínua de outras características, além do biofilme e da motilidade, que possam influenciar nos mecanismos de patogenicidade.

Palavras-chave: VBNC, qPCR, biofilme e motilidade *swarming*

ABSTRACT

The Northeast region stands out as the largest producer of fine table grapes, corresponding to 99% of Brazilian exports of the fruit. In this region, bacterial canker of the grapevine, caused by *Xanthomonas citri* pv. *viticola*, is one of the main plant bacteriosis that threatens this crop. To achieve effective disease management, it is essential to understand the pathogenesis mechanisms of the bacterium, the plant-pathogen interaction, and how the environment affects the pathogen and the disease. In this context, understanding the dynamics of bacterial growth and the influence of temperature on the physio-pathological behavior of bacteria becomes essential to prevent the spread of the pathogen and create efficient strategies for managing the disease. Thus, the present work evaluated the ability to form viable but non-culturable cells (VBNC) and the physio-pathological behavior of *X. citri* pv. *viticola* under temperature stress. The CCRMXCV17, CCRMXCV80 and CCRMXCV117 strains had their growth curves determined, the logarithmic phase being observed at 96 h for all strains, while the death phase was observed at 480 h for the CCRMXCV17 strain and 288 h for the other two strains. With qPCR analysis, the occurrence of VBNC state was confirmed at 480 h for the strain CCRMXCV17 and 288 h for CCRMXCV80 and CCRMXCV117. The incubation period (IP) and the final severity (FS) of the artificial inoculation of the strains in the logarithmic and VBNC phases, did not obtain a significant interaction ($P>0.05$) between the phase and isolate factors, however, there was a significant difference in the IP between the means of the strain factor. All strains were resuscitated at the VBNC stage after inoculation in NYD medium. However, only the strain CCRMXCV117 showed a significant difference between the concentrations of the exponential and VBNC phases. The strains were cultivated at temperatures 29, 33, 37, 41, and 45 °C and inoculated in grapevine seedlings to determine the epidemiological components of bacterial canker and were evaluated for *in vitro* biofilm formation and influence of swarming motility. The inoculation of strains cultivated under temperature stress showed a significant interaction between the factors, strain and temperature, only for the FS parameter. Weak biofilm matrix formation was observed in all strains, with a significant interaction between the factors, temperature and strain. Swarming motility under temperature stress was not detected in all three strains, since the colony growth was restricted to the center of the plate, however, there was a significant difference between the means of the factors evaluated individually. This is the first report of the occurrence of VBNC condition in strains of *X. citri* pv. *viticola*, as well as the pathogenic capacity at this stage. Thus, we emphasize the importance of applying a set of techniques for more accurate detection of this disease, as well as the continuous research of other characteristics, beyond biofilm and motility, that may influence the mechanisms of pathogenicity.

Keywords: VBNC, qPCR, biofilm e swarming motility

CAPÍTULO I

Introdução Geral

INTRODUÇÃO GERAL

1. A cultura da videira

O cultivo da videira (*Vitis L. spp*) está presente em quase todo território nacional, mas se concentra principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste do país (LEÃO; SILVA, 2014). Na região Nordeste, em particular no Submédio do Vale do São Francisco, a viticultura se destaca pela área cultivada e volume da produção, como também pelos altos rendimentos obtidos e na qualidade das frutas produzidas (LEÃO, 2004). A região possui temperaturas elevadas o ano todo, alta insolação e baixa umidade relativa, que em conjunto com a disponibilidade de água para irrigação favorecem o crescimento vegetativo contínuo, e possibilita a obtenção de cinco safras a cada dois anos. Dessa forma, é possível escalonar as colheitas do vinhedo para coincidir com os períodos de entressafra, sendo esta a principal vantagem competitiva do Vale do Submédio do São Francisco (LEÃO; SILVA, 2014).

A videira está presente na região nordestina desde o século XVI, nos estados de Pernambuco e Bahia. No entanto, a partir de 1990 foi observado uma intensificação da viticultura, com a expansão das áreas cultivadas e o maior aporte tecnológico no setor, além da introdução de diversas variedades (LEÃO; POSSÍDIO, 2000). Tais ações colaboraram para tornar a viticultura uma das cadeias produtivas da agricultura irrigada mais significativas da região Nordeste, fazendo com que, em 2022, aproximadamente 30,8% da produção e 13,8% da área cultivada no Brasil estivessem centralizados no Submédio do Vale do São Francisco (IBGE, 2022). Adicionalmente, a uva de mesa é terceira fruta mais exportada no Brasil, sendo a região Nordeste responsável por 99% das exportações brasileiras desde o ano de 2002 (COMEXSTAT, 2021).

Proveniente do Oriente, a videira pode ser agrupada em dois tipos: a européia (*V. vinifera L.*), originária da Ásia Central, em regiões que detém o clima típico mediterrâneo, e a videira americana (*V. labrusca L.* e outras espécies), da América do Norte (NASCIMENTO, 2005). Além disso, a videira pode ser cultivada para diversas finalidades, e classificada comercialmente em: uvas de mesa (*in natura*), vinhos, passas e sucos (LEÃO, SILVA, 2014).

A videira é um arbusto que possui caule trepador e sarmentoso, o qual se fixa em suportes artificiais ou naturais, por meio das gavinhas, órgãos vegetativos especializados. As flores são agrupadas em inflorescências designadas cachos compostos. Os frutos são bagas pedunculadas, agrupadas em cachos de tamanho versátil, o qual se apresentam compactos ou soltos, conforme o número de bagas (QUEIROZ-VOLTAN; PIRES, 2003).

Os ciclos vegetativos da videira se apresentam em sucessão, intercalados por períodos de repouso. A videira cresce e se desenvolve melhor em regiões com verões longos e secos, moderadamente quentes, e com invernos frios para satisfazer as necessidades de repouso vegetativo (PEDRO JÚNIOR; SENTELHAS, 2003). Por outro lado, em condições semiáridas, o repouso vegetativo ocorre durante a época seca. O clima quente aliado ao sistema de irrigação otimiza os processos fisiológicos das plantas e o ciclo de produção varia em torno de 120 dias, proporcionando mais de uma produção ao longo do ano, com alta produtividade (LEÃO, 2004).

2. Doenças da videira

A viticultura no Submédio do Vale do São Francisco pode ser considerada um empreendimento de sucesso devido aos aspectos econômicos e sociais. Vários fatores colaboraram para o êxito dessa expansão no Nordeste, como as condições de solo e clima, uso da irrigação e de fitorreguladores (FERREIRA, 2016; LEÃO; SILVA, 2014). Contudo, embora a expansão da área cultivada no Brasil tenha vários aspectos positivos, essa expansão também proporcionou a ocorrência de doenças na videira, sobretudo devido ao plantio de material suscetível, a existência simultânea dos vários estádios fenológicos da planta nos parreirais, condições ambientais favoráveis, importação de materiais genéticos e circulação de material de propagação não certificado (FERREIRA, 2016).

A videira pode ser atacada por diversos patógenos, como fungos, vírus, bactérias e nematoides. No território brasileiro, as principais doenças causadas por fungos são: antracnose (*Elsinoe ampelina* (de Bary) Shear), míldio (*Plasmopara viticola* (Berk & Curlis) Berl & de Toni), oídio (*Uncinula necator* (Schw.) Burril), fusariose (*Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *herbemontis* Tocchetto), mofo cinzento (*Botrytis cinerea* Pers.: Fr.) e ferrugem (*Phakopsora euveitis*). Dentre as viroses, ressaltam-se: mosaico das nervuras (*Grapevine fleck virus*), enrolamento da folha (*Grapevine leafroll-associated virus*), complexo do lenho rugoso (*Grapevine virus A* e *Grapevine virus B*), mosaico da videira traviú (*Grapevine fanleaf virus*) e necrose das nervuras (*Grapevine vein necrosis virus*) (AMORIM; KUNIYUKI, 1995; BARBOSA et al, 2016). Entre as infecções ocasionadas por nematoides, destacam-se os gêneros *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp., *Xiphinema* spp. e *Tylenchulus semipenetrans* (NAVES, 2005). Em relação as principais fitobacterioses, ressaltam-se o cancro bacteriano da videira (*Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Nayudu) Gama et al.) (TAVARES; LIMA; MELO, 2009) e a galha da coroa (*Rhizobium radiobacter* e *R. vitis*)

(FERREIRA, 2016).

O cancro bacteriano da videira é a fitobacteriose de maior importância fitossanitária no Submédio do Vale do São Francisco, sendo relatados depreciação total de parreirais da cultivar “Red Globe” e algumas variedades sem sementes (TAVARES; LIMA; MELO, 2009). Em razão de seu prejuízo e agressividade, *X. citri* pv. *viticola* é enquadrada na categoria de praga quarentenária presente e a doença está, atualmente, sob controle oficial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e sendo assim, é considerada como uma ameaça constante nas áreas de cultivo (MAPA, 2018).

3. Cancro bacteriano da videira

A doença foi observada pela primeira vez na Índia em 1969 e seu agente causal foi descrito em 1972, como *Pseudomonas viticola* Nayudu (NAYUDU, 1972), o qual foi reclassificado como *X. campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, em 1978 (FERREIRA, 2016). Recentemente, a bactéria foi reclassificada taxonomicamente como *X. citri* pv. *viticola* (Nayudu) Gama et al. devido a relação genética com patovares de *X. citri* (GAMA et al., 2018).

No Brasil a doença foi detectada em março de 1998, em regiões produtoras no Submédio do Vale do São Francisco, em Petrolina, PE. A doença foi identificada, primeiramente, no cultivar Red Globe, e posteriormente, no mesmo ano, em Teresina, PI, nas variedades Red Globe, Itália e Ribier (MALAVOLTA et al., 1999). A doença também foi registrada nos municípios de Curaçá, Casa Nova, Sento Sé e Juazeiro, no Estado da Bahia (LIMA et al., 1999). Nos anos seguintes, a presença do patógeno foi confirmada em Jaguaruana, CE (FREIRE; OLIVEIRA, 2001), Boa Vista, RR (HALFELD-VIEIRA; NECHET, 2006), Formosa, GO (JUNQUEIRA et al., 2006), Tupi Paulista, SP (RODRIGUES NETO et al., 2011) e Cianorte, PR (TOMAZ et al., 2011).

Atualmente, conforme a última Instrução Normativa do MAPA, Nº 38/2018, a doença encontra-se presente nos estados da Bahia, Ceará, Pernambuco e Roraima (MAPA, 2018). Os estados do Paraná e São Paulo realizaram ações de erradicação dos focos, sendo reconhecidos pelo MAPA, e ambos ainda mantêm a praga sob monitoramento (ASCOM, 2021).

O principal sintoma do cancro bacteriano da videira é o surgimento de cancrios, isto é, fissuras longitudinais nos ramos, nervuras, pecíolos e ráquis dos frutos, as quais são resultantes da evolução de manchas escuras deprimidas e alongadas. Com o agravamento da doença, a infecção pode atingir o sistema vascular dos ramos, se tornando sistêmica, o que

dificulta o seu manejo. Nas folhas são observadas pequenas lesões necróticas e angulares, com ou sem halos amarelados, que coalescem e formam grandes áreas necróticas (LIMA, 2000). Similarmente, os cachos podem apresentar lesões necróticas arredondadas, desuniformes na cor e no tamanho, bem como murcha das bagas quando ocorre cancos no engaço (BARBOSA; JUNIOR; BATISTA, 2016).

O ciclo da doença se inicia por meio da introdução de mudas ou bacelos infectados, que irão originar plantas doentes. Uma vez em circulação, o patógeno é disseminado através de respingos de chuva ou irrigação, e quando associados a ventos aumentam a intensidade da doença. Restos de cultura espalhados pelos parreirais também favorecem a disseminação da bactéria, além dos tratos culturais, mecânicos e manuais, e as ferramentas utilizadas nas colheitas de frutos favorecem a penetração da bactéria (NASCIMENTO, 2005; NAUE et al., 2014).

Temperatura e umidade relativa do ar elevadas são condições favoráveis para o desenvolvimento da doença nos parreirais. Em períodos chuvosos, a incidência e a severidade podem ser agravadas, favorecendo a exsudação do pus bacteriano e propiciando a disseminação do patógeno no campo (LIMA, 2000). Paralelamente, o patógeno sobrevive epifiticamente em plantas de videira assintomáticas e em hospedeiros alternativos, e é capaz de sobreviver em restos culturais por até 80 dias em elevadas populações (SILVA et al., 2012).

4. Características do gênero *Xanthomonas*

O gênero *Xanthomonas* pertence a classe Gammaproteobacteria e a família *Xanthomonadaceae*, a qual contém doze gêneros. Este gênero é constituído por bactérias Gram-negativas, com formato de bastonetes retos e tamanho variando entre 0,8 a 2,0 µm de comprimento e 0,4 a 0,6 µm de largura. São monotríquias, aeróbicas obrigatórias, com catalase positiva e reação de oxidase negativa ou fraca, além de serem incapazes de realizar desnitrificação (SADDLER; BRADBURY, 2005).

Uma particularidade deste gênero é a produção de um pigmento amarelo denominado xantomonadina, embora algumas espécies não o produzem, como é o caso de *X. citri* pv. *viticola* e alguns isolados de *X. citri* pv. *anacardii* (GAMA et al., 2018). Essas células bacterianas produzem altas quantidades de exopolissacarídeos em meios ricos em glicose, conhecidos como goma xantana, utilizada na produção de alimentos e na formulação de produtos químicos (KADO, 2010).

Há mais de 100 bactérias de relevância fitopatológica dentro desse gênero, tais como *X.citri*, *X. campestris*, *X. axonopodis*, e seus patovares, os quais possuem várias características que os distinguem (KADO, 2010). Os isolados de *Xanthomonas* podem causar doenças em mais de 120 espécies de monocotiledôneas e mais de 250 espécies de dicotiledôneas. Desta forma, os danos ocasionados pelo gênero *Xanthomonas* à agricultura mundial o fazem seriamente importante, uma vez que três espécimes e seus patovares compõem o grupo das dez principais fitobacterioses estudadas no mundo (MANSFIELD et al., 2012).

As bactérias do gênero *Xanthomonas* fazem uso de diversos mecanismos de virulência e patogenicidade para infectar e se multiplicar nas plantas hospedeiras. Dentre os quais, ressalta-se as adesinas, complexos proteicos encarregados pela adesão da bactéria em superfícies compostas por moléculas alvo, como exsudados oriundos de ferimentos ou tecidos vegetais (KLEMM; SCHEMBRI, 2000). Além disso, seis sistemas de secreção foram observados em espécies de *Xanthomonas*, com diferentes funcionalidades na virulência e patogenicidade dessas bactérias (KADO, 2010). Os polissacarídeos extracelulares (EPS) representam um outro fator de virulência, os quais interferem na formação dos sintomas da doença e sobrevivência epifítica das bactérias, e consequentemente na severidade das doenças (BÜTTNER; BONAS, 2010).

5. Células viáveis e não cultiváveis (VBNC)

Células viáveis e não cultiváveis (viable but nonculturable cells – VBNC) é uma condição na qual as células bacterianas são incapazes de crescer em meio de cultura, mas são capazes de permanecer vivas e aptas a retornar suas atividades metabólicas em condições favoráveis (OLIVER, 2010). Nesse contexto, quando confrontadas com fatores que limitam a sobrevivência, a maioria das células bacterianas morre, mas algumas células permanecem no estado de VBNC, tendendo a exibir baixa atividade metabólica, e se tornando totalmente cultiváveis após reversão desse mecanismo (OLIVER, 2005).

As bactérias aptas a entrar em estado VBNC geralmente são induzidas por condições de estresse, como os incitados pelo déficit nutricional (ABURJAILE et al., 2016), pH desfavorável, temperaturas extremas, radiação UV, agentes químicos antibacterianos, principalmente aqueles derivados de cobre e estresse oxidativo (KAN et al., 2019). A fim de reverter o estado de VBNC, condições específicas como ambiente rico em nutrientes necessários à sobrevivência da bactéria ativam os mecanismos metabólicos, o que resulta na

chamada ressuscitação do procarioto (SU et al., 2016). Assim, Amel e Amina (2018) relataram a ocorrência da ressurreição em longos períodos após a indução do mecanismo nas bactérias, por meio do contato com o organismo hospedeiro, como foi observado em células de *Salmonella enterica* recuperadas 17 anos após a indução do estado VBNC através da carência nutricional.

O estado de VBNC foi observado em diversas bactérias, tanto em microrganismos patogênicos a mamíferos, como *Salmonella* spp. (AMEL; AMINA, 2008), e como em organismos fitopatogênicos, como *Rhizobium radiobacter* (GHEZZI; STECK, 1999), *P. syringae* (POSTNIKOVA et al., 2015), *R. solanacearum* (KONG et al., 2014), *Acidovorax citrulli* (KAN et al., 2019) e *X. citri* pv. *anacardii* (LUCENA, 2019). Ghezzi e Steck (1999) realizaram o primeiro estudo do estado VBNC no gênero *Xanthomonas*, especificadamente, em *X. campestris* pv. *campestris*. Entretanto, grande parte dos trabalhos realizados com *X. citri* subsp. *citri*, avaliaram a indução do mecanismo de VBNC através da utilização de compostos cúpricos (GOLMOHAMMADI et al., 2013).

Atualmente, o esclarecimento da ocorrência das VBNC está sendo realizado por meio dos estudos moleculares, como o qPCR (Polymerase Chain Reaction Real Time), o qual quantifica os genes ligados ao estado de viabilidade (DONG et al., 2020). Através desses estudos vem sendo possível identificar genes ligados à VBNC atuando em diferentes mecanismos do metabolismo das células bacterianas, como gene *relA* relacionado à resistência a estresse ambiental, gene *fliG*, responsável pela motilidade (ASAKURA et al., 2007) *dps*, atuante na proteção contra estresse oxidativo, *tnaA*, o qual atua na formação de biofilme (MENG et al., 2015), e genes do metabolismo e composição da parede celular (POSTNIKOVA et al., 2015).

6. Formação de biofilmes e motilidade de *X. citri* pv. *viticola*

Biofilmes são aglomerados de células bacterianas planctônicas, isto é, de vida livre, as quais se agregam formando uma matriz de material extracelular, conhecida como polissacarídeos extracelulares ou exopolissacarídeos (EPS). Não somente, a matriz do biofilme também é composta por proteínas, ácido nucleicos, lipídios e outros biopolímeros. E é por meio desses biopolímeros, os quais se agregam em andaimes biológicos, que a arquitetura de três dimensões do biofilme é formada (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Os biopolímeros são responsáveis pela aderência em superfícies e a coesão do biofilme

tridimensional. O EPS imobiliza as células bacterianas e as mantém unidas, permitindo uma maior interação e comunicação célula-célula. A matriz também possui função de proteção contra dessecação, oxidação, antibióticos e cátions metálicos, radiação ultravioleta, alguns protozoários e defesa imunológica do hospedeiro (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Por sua ação protetiva contra fatores bióticos e abióticos, além de adesão na superfície do hospedeiro, biofilmes podem agir como fator de virulência nos primeiros estádios da infecção e colonização. Assim essas comunidades coordenadas, funcionais e altamente organizadas dão a algumas espécies bacterianas fitopatogênicas maior virulência e maior resistência a compostos antimicrobianos (SENA-VÉLEZ et al., 2015).

Após a penetração no hospedeiro, a formação do biofilme permite que o patógeno mantenha uma massa mínima de células bacterianas dentro do tecido vegetal. Para isso, o desenvolvimento do biofilme sofre a influência de diversos fatores como os genótipos da bactéria e hospedeiro, humidade, pH, nutrientes exógenos e temperatura, os quais consistem em uma sequência de eventos. Primeiro a bactéria entra em contato com a superfície do vegetal hospedeiro por meio da motilidade ativa. Em seguida, ocorre adsorção na superfície, replicação celular, produção de *quorum sensing*, e liberação de células bacterianas planctônicas do biofilme (SENA-VÉLEZ et al., 2015).

O gênero *Xanthomonas*, em sua maioria, é conhecido pela produção abundante de EPS, chamada de xantana, componente imprescindível para a criação da matriz de biofilme. Esse polissacarídeo atua como uma cola molecular, que confere benefícios como adesão, proteção, e estruturação, permitindo que a bactéria se fixe em superfícies bióticas e abióticas (NAQVI et al., 2022). Além disso, esse componente faz-se presente no terceiro estágio, formação da matriz de EPS, dentre os cinco estágios de formação do biofilme (JANISSEN et al., 2015). Desta forma, Guerra (2017) observou a formação de biofilme em sete isolados de *X. citri* pv. *viticola* as quais variaram entre não aderente, fraca, moderada a forte. Dentre os isolados, o estudo encontrou dois com estrutura monocamada de biofilme, promovida pelas interações entre superfície-célula.

Outro aspecto importante para a bactéria é a motilidade, que coordenada por estímulos bioquímicos direcionam a bactéria para o local ideal para adesão e agrupamento na superfície da planta hospedeira, e também na penetração pelas aberturas naturais ou ferimentos. Assim, por estar associada ao início da formação do biofilme, alguns trabalhos confirmaram essa relação como em isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (SENA-VÉLEZ et al., 2015), *Acidovorax citrulli* (BAHAR; DE LA FUENTE; BURDMAN, 2010), *Burkholderia cenocepacia* lineages IIIA e IIIB e *B. gladioli* pv. *alliicola* (SILVA et al., 2021).

7. Influência de temperaturas elevadas na fisiologia, patogenicidade e virulência de fitobactérias

Temperatura e umidade na superfície da planta são os fatores ambientais que influenciam no início e no desenvolvimento nas doenças fitopatogênicas. Para a emergência da doença deve-se ocorrer a combinação de três fatores: planta hospedeira suscetível, patógeno infeccioso e ambiente favorável. Enquanto a planta suscetível e o patógeno permanecem essencialmente inalterados, as condições ambientais variam em diferentes graus, cuja consequência é o favorecimento ao hospedeiro, patógeno ou ambos ou pode ser mais favorável a um do que ao outro. Como resultado, ocorrerá a doença de acordo com a variação das condições ambientais, as quais influenciam na dimensão, frequência e severidade (AGRIOS, 2005).

Além disso, bactérias se multiplicam por reprodução assexual, na qual uma célula-mãe origina duas células-filhas. Desta forma, a divisão celular também é denominada crescimento. Assim, o crescimento das células bacterianas depende da espécie, fatores físicos como temperatura, pH e concentrações de sais, além de fatores nutricionais (JANSE, 2005). A temperatura é um dos fatores mais importantes no meio, visto que influencia no crescimento, absorção de nutrientes e a sobrevivência dos microrganismos, definindo a velocidade das reações metabólicas (NASCIMENTO, 2005).

Desta forma, a temperatura é um fator abiótico e físico requerido, em um grau mínimo, para o desenvolvimento tanto das plantas quanto dos patógenos (AGRIOS, 2005). Assim, o metabolismo celular de uma bactéria está diretamente relacionado aos fatores do meio ambiente, e para atingir seu desenvolvimento máximo, as células bacterianas precisam, entre outros, de condições ideais de temperatura (NASCIMENTO, 2005).

No campo, bactérias fitopatogênicas podem sobreviver e se multiplicar epifiticamente, ou seja, sob a superfície da planta hospedeira, dentro do intervalo de crescimento ótimo o qual varia entre espécies, mas também devem lidar com as oscilações das condições de temperatura (JANSE, 2005; SUMARES et al., 2016). Sumares et al. (2016) relatou a influência da temperatura no desenvolvimento de *X. citri* subsp. *citri*, agente causal do cancro cítrico, observando que expondo a bactéria ao estresse térmico de 37 °C ocorreu uma pausa na divisão celular, mas ainda foi capaz de induzir sintomas de cancro cítrico. Entretanto, a exposição das células bacterianas à 40 e 42 °C comprometeu a viabilidade celular e a capacidade de colonizar o hospedeiro.

Portanto, desenvolver pesquisas visando a compreensão destes mecanismos de patogenicidade citados sob a influência de temperaturas elevadas são essenciais para auxiliar nas estratégias de manejo da doença. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram a determinação do estado de VBNC de isolados de *X. citri* pv. *viticola* nessa fase, assim como avaliar a formação de biofilme, motilidade *swarming* e a patogenicidade sob estresse térmico.

Referências bibliográficas

- ABURJAILE, F. F.; ROHMER, M.; PARRINELLO, H.; MAILLARD, M.; BEAUCHER E.; HENRY, G.; NICOLAS, A.; MADEC, M.; THIERRY, A.; PARAYRE, S.; DEUTSCH, S.; BOUSQUET, M. C.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; LE LOIR, Y.; FALENTIN, H. Adaptation of *Propionibacterium freudenreichii* to long-term survival under gradual nutritional shortage. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 1–13, 2016.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. ed. Elsevier Academic Press, 2005.
- AMEL, D.; AMINA, B. Resuscitation of Seventeen-year Stressed *Salmonella typhimurium*. **Oceanological and Hydrobiological Studies**, v. 37, n. 1, p. 69–82, 2008.
- AMORIM, L.; KUNIYUKI, H. Doenças da Videira. In: KIMATI, H. et al. (Eds.). **Manual de Fitopatologia. Volume 2: Doenças das Plantas Cultivadas**. 3. ed. São Paulo, SP: Agronômica Ceres, 1995. p. 687–706.
- ASAKURA, H.; ISHIWA, A.; ARAKAWA, E.; MAKINO, S.; OKADA, Y.; YAMAMOTO, S.; IGIMI, S. Gene expression profile of *Vibrio cholerae* in the cold stress-induced viable but non-culturable state. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 869–879, 2007.
- ASCOM, J. V. **CIDASC realiza levantamento para detecção da praga Cancro Bacteriano da Videira em áreas de produção catarinense**. Disponível em: <<http://www.cidasc.sc.gov.br/blog/2021/01/06/cidasc-realiza-levantamento-para-deteccao-da-praga-cancro-bacteriano-da-videira-em-areas-de-producao-catarinense/>>. Acesso em: 18 jun. 2021.
- BAHAR, O.; DE LA FUENTE, L.; BURDMAN, S. Assessing adhesion, biofilm formation and motility of *Acidovorax citrulli* using microfluidic flow chambers. **FEMS Microbiology Letters**, v. 312, n. 1, p. 33–39, 2010.
- BARBOSA, A. G. et al. Doenças da videira. **Informe Agropecuário: Manejo de doenças de fruteiras de clima temperado, subtropical e tropical**, v. 37, n. 291, p. 86–98, 2016.
- BARBOSA, M. A. G.; JÚNIOR, P. M. R.; BATISTA, D. DA C. Manejo do cancro bacteriano da videira no Vale do São Francisco. In: GAMA, M. A. S. DA et al. (Eds.). **Estado da Arte em Fitobarioses Tropicais**. Recife, PE: Editora Universitária da UFRPE, 2016. p. 229–242.
- BÜTTNER, D.; BONAS, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 2, p. 107–133, 2010.
- COMEXSTAT. Sistema de Estatísticas do Comércio Exterior. **Exportação e importação geral**. Disponível em: <<http://comexstat.mdic.gov.br/pt/comex-vis>>. Acesso em: 4 jun. 2021.
- SILVA, P. H. R.; ASSUNÇÃO, E. F.; VELEZ, L. S.; SANTOS, L. N.; SOUZA, E. B.; GAMA, M. A. S. Biofilm formation by strains of *Burkholderia cenocepacia* lineages IIIA and IIIB and *B. gladioli* pv. *alliicola* associated with onion bacterial scale rot. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 1665–1675, 2021.
- DONG, K.; PAN, H.; YANG, D.; RAO, L.; ZHAO, L.; WANG, Y.; LIAO, X. Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 1, p. 149–183, 2020.

FERREIRA, M. A. S. V. Detecção e variabilidade de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, agente causal do cancro bacteriano da videira. In: GAMA, M. A. S. et al. (Eds.). **Estado da Arte em Fitobacterioses Tropicais**. Recife, PE: Editora Universitária da UFRPE, 2016. p. 211–228.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623–633, 2010.

FREIRE, F. C. O.; OLIVEIRA, A. S. Ocorrência do cancro-bacteriano da videira no Estado do Ceará. **Embrapa Agroindústria tropical - Comunicado Técnico**, v. 62, p. 2, 2001.

GAMA, M. A. S.; MARIANO, R. L. R.; JÚNIOR, W. J. S.; FARIAS, A. R. G.; BARBOSA, M. A. G.; FERREIRA, M. A. S. V.; JÚNIOR, C. R. L. C.; SANTOS, L. A.; SOUZA, E. B. 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**, v. 108, n. 10, p. 1143–1153, 2018.

GHEZZI, J. I.; STECK, T. R. Induction of the viable but non-culturable condition in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in liquid microcosms and sterile soil. **FEMS Microbiology Ecology**, 1999.

GOLMOHAMMADI, M.; CUBERO, J.; LÓPEZ, M. M.; LLOP, P. The viable but non-culturable state in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* is a reversible state induced by low nutrient availability and copper stress conditions. **Journal of Life Sciences**, v. 7, n. 10, p. 1019–1029, 2013.

GUERRA, M. L.; MALAFAIA, C. B.; MACEDO, A. J.; SILVA, M. V.; MARIANO, R. L. R.; SOUZA, E. B. Biofilm formation by *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* affected by abiotic surfaces and culture media. **Tropical Plant Pathology**, v. 43, n. 2, p. 146–151, 2017.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. D. L. Bacterial canker of grapevine in Roraima, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 6, p. 604, 2006.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). **Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado>>. Acesso em: 8 jul. 2022.

JANISSEN, R.; MURILLO, D. M.; NIZA, B.; SAHOO, P. K.; NOBREGA, M. M.; CESAR, C. L.; TEMPERINI, M. L. A.; CARVALHO, H. F.; SOUZA, A. A.; COTTA, M. A. Spatiotemporal distribution of different extracellular polymeric substances and filamentation mediate *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm formation. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–10, 2015.

JANSE, J. D. **Phytopathology: principles and practice**. Wageningen, The Netherlands: CABI Publishing, 2005.

JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNQUEIRA, K. P.; BRAGA, M. F.; VAZ, C. F.; SANTOS, E. C.; JUNQUEIRA, L. P.; SOUZA, L. S.; LIMA, C. A. Ocorrência do cancro bacteriano da videira na região do entorno do Distrito Federal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. 19, 2006, Cabo Frio. **Proceedings...** Rio de Janeiro: SBF, 2006. p. 323.

KADO, C. **Plant bacteriology**. St. Paul, Minnesota USA: The American Phytopathological Society, 2010.

KAN, Y.; JIANG, N.; XU, X.; LYU, Q.; GOPALAKRISHNAN, V.; WALCOTT, R.; BURDMAN, S.; LI, J.; LUO, L. Induction and Resuscitation of the Viable but Non-culturable (VBNC) State in *Acidovorax citrulli*, the Causal Agent of Bacterial Fruit Blotch of Cucurbitaceous Crops. **Frontiers in Microbiology**, 2019. DOI 10.3389/fmicb.2019.01081.

KLEMM, P.; SCHEMBRI, M. A. Bacterial adhesins: Function and structure. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 290, n. 1, p. 27–35, 2000.

KONG, H. G.; BAE, J. Y.; LEE, H. J.; JOO, H. J.; JUNG, E. J.; CHUNG, E.; LEE, S. W. Induction of the viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* by low temperature in the soil microcosm and its resuscitation by catalase. **PLoS ONE**, 2014. DOI 10.1371/journal.pone.0109792.

LEÃO, P. C. S.; SILVA, D. J. **Cultivo da videira no semiárido brasileiro**. In: PIO, R. (Ed.). Cultivo de fruteiras de clima temperado em regiões subtropicais e tropicais. 1. ed. Lavras: UFLA, 2014. p. 578–618.

LEÃO, P. C. S. **Cultivo da videira**. Sistemas de Produção. Embrapa Semiárido, v. 1, p. 89, 2004.

LEÃO, P. C. S.; POSSÍDIO, E. L. Histórico da videira. In: **A viticultura no Semi-Árido Brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2000. p. 13–17.

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

LIMA, M. F. Cancro bacteriano da videira, causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*: Epidemiologia e Manejo. **Circular Técnica da Embrapa Semi-Árido**, v. 54, p. 23, 2000.

LUCENA, L. P. **Caracterização de células viáveis e não cultiváveis em *Xanthomonas citri* pv. *anacardii***. 2019. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2019.

MALAVOLTA JR., V. A.; ALMEIDA, I. M. G.; SUGIMORI, M. H.; RIBEIRO, I. J. A.; RODRIGUES NETO, J.; PIRES, E. J. P.; NOGUEIRA, E. M. C. *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videira no Estado do Piauí. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 27, 1999.

MANSFIELD, J.; GENIN, S.; MAGORI, S.; CITOVSKY, V.; SRIARIYANUM, M.; RONALD P.; DOW, M.; VERDIER, V.; BEER, S. V.; MACHADO, M. A.; TOTH, I.; SALMOND, G.; FOSTER, G. D. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, p. 614–629, 2012.

MAPA. **Pragas Quarentenárias Ausentes - PQA**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal>>. Acesso em: 24 mar. 2019.

MENG, L.; ALTER, T.; AHO, T.; HUEHN, S. Gene expression profiles of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but non-culturable state. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 91, n. 5, p. 35, 2015.

NAQVI, S. A. H.; WANG, J.; MALIK, M. T.; UMAR, U. U. D.; REHMAN, A. U.; HASNAIN, A.; SOHAIL, M. A.; SHAKEEL, M. T.; NAUMAN, M.; REHMAN, H.; HASSAN, M. A.; FATIMA, M.; DATTA, R. Citrus Canker – Distribution, Taxonomy, Epidemiology, Disease Cycle, Pathogen Biology, Detection, and Management: A Critical Review and Future Research Agenda. **Agronomy**, 2022. DOI 10.3390/agronomy12051075.

NASCIMENTO, A. R. P.; MARIANO, R. L. R.; GAMA, M. A. S. Métodos de preservação e crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em meio de cultura variando temperatura, pH e concentração de NaCl. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 6, p. 650–654, 2005.

NAUE, C. R.; COSTA, V. S. O.; BARBOSA, M. A. G.; BATISTA, D. C.; SOUZA, E. B.; MARIANO, R. L. R. *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* on grapevine cutting tools and water: Survival and disinfection. **Journal of Plant Pathology**, v. 96, n. 3, p. 451–458, 2014.

NAVES, R. L. Diagnose e manejo de doenças acusadas por fitonematóides na cultura da videira. **Circular Técnica - EMBRAPA**, v. 57, n. Bento Gonçalves, RS, p. 12, 2005.

OLIVER, J. D. The viable but nonculturable state in bacteria. **The Journal of Microbiology**, The Microbiology Society of Korea, v. 43, p. 93-100, 2005.

OLIVER, J. D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, p. 415–425, 2010.

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

POSTNIKOVA, O. A.; SHAO, J.; MOCK, N. M.; BAKER, C. J.; NEMCHINOV, L. G. Gene expression profiling in viable but nonculturable (VBNC) cells of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **Frontiers in Microbiology**, 2015. DOI 10.3389/fmicb.2015.01419.

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

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

SADDLER, G. S.; BRADBURY, J. F. Xanthomonadales ord. nov. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (Eds.). **Bergey's of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria**. 2. ed. Boston: Springer, 2005. p. 63–122.

SENA-VÉLEZ, M.; REDONDO, C.; GELL, I.; FERRAGUD, E.; JOHNSON, E.; GRAHAM, J. H.; CUBERO, J. Biofilm formation and motility of *Xanthomonas* strains with different citrus host range. **Plant Pathology**, v. 64, n. 4, p. 767–775, 2015.

SILVA, A. M. F.; MENEZES, E. F.; SOUZA, E. B.; MELO, N. F.; MARIANO, R. L. R. Sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em tecido infectado de videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 3, p. 757–765, set. 2012.

SU, X.; GUO, L.; DING, L.; QU, K.; SHEN, C. Induction of viable but nonculturable state in *Rhodococcus* and transcriptome analysis using RNA-seq. **PLoS ONE**, 2016. DOI 10.1371/journal.pone.0147593.

SUMARES, J. A. P.; MORÃO, L. G.; MARTINS, P. M. M.; MARTINS, D. A. B.; GOMES, E.; BELASQUE JUNIOR, J.; FERREIRA, H. Temperature stress promotes cell division arrest in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Microbiology Open**, v. 5, n. 2, p. 244–253, 2016.

TAVARES, S. C. C. DE H.; LIMA, M. F.; MELO, N. F. DE. Principais doenças da videira e alternativas de controle. In: SOARES, J. M.; LEÃO, P. C. DE S. (Eds.). **A viticultura no Semi-Árido Brasileiro**. 1. ed. Petrolina, PE: Embrapa, 2009. p. 293–346.

TOMAZ, R.; SCREMIN, R. M.; FERREIRA, M. A. S. V.; BARBOSA, M. A. G. Detecção e erradicação de videiras com sintomas do cancro bacteriano no Estado do Paraná. Tropical Plant Pathology. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 44, 2011, Bento Gonçalves. **Anais [...]** Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2011. p. 896.

CAPÍTULO II

Determination of VBNC state and physio-pathological characterization of *Xanthomonas citri* pv. *viticola* under temperature stress

European Journal of Plant Pathology

Determination of VBNC state and physio-pathological characterization of *Xanthomonas citri* pv. *viticola* under temperature stress

Fernanda de Pádua Del Corona • Lucas Pontes de Lucena • Elineide Barbosa de Souza • Ana Maria Benko-Iseppon • Flávia Figueira Aburjaile* • Marco Aurélio Siqueira da Gama*

*These authors contributed equally to this work.

F. P. Corona • L. P. Lucena • M. A. S. Gama*

Agronomy Department, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

*e-mail: marco.gama@ufrpe.br

E. B. Souza

Biology Department, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

A. M. Benko-Iseppon

Genetic Department, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

F. F. Aburjaile

Preventive Veterinary Medicine Department, Veterinary School, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

ORCID

F. P. Corona 0000-0002-1927-4736

L. P. Lucena 0000-0001-6061-2621

E. B. Souza 0000-0003-1281-3490

A. M. Benko-Iseppon 0000-0002-0575-3197

F. F. Aburjaile 0000-0002-1067-1882

M. A. S. Gama: 0000-0001-6153-1700

Resumo O cancro bacteriano da videira, causado por *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Gama et al. 2018, é um dos principais patógenos que ameaçam a região Nordeste, a qual se destaca como maior produtora de uvas finas de mesa. A temperatura é um dos fatores físicos que influenciam o desenvolvimento e sobrevivência das bactérias, influenciando os mecanismos de patogênese. Assim, o presente trabalho avaliou a capacidade de atingir o estado de células viáveis, mas não cultiváveis (VBNC), ressuscitação e infecciosidade nesta condição; como também, a formação de biofilme, motilidade *swarming* e patogenicidade sob estresse térmico de *X. citri* pv. *viticola*. Primeiramente, as fases de crescimento dos isolados CCRMXCV17, CCRMXCV80 e CCRMXCV117 foram determinadas. A fase exponencial foi observada às 96 horas para todos os isolados, e a fase de morte às 480 horas para o CCRMXCV17 e 288 horas para os outros dois isolados. A ocorrência do estado VBNC foi confirmada com a análise *quantitative polymerase chain reaction* (qPCR), assim como a

inoculação artificial dos isolados na fase VBNC não apresentou interação significativa entre os fatores de severidade final (FS) e período de incubação (IP). A capacidade de ressuscitação foi observada em todos os isolados e o CCRMXCV117 apresentou diferença significativa entre as fases exponencial e VBNC. Sob estresse de temperatura, a inoculação artificial apresentou interação significativa na severidade final entre os fatores isolados e temperaturas. A formação de biofilme, submetida ao estresse de temperatura, mostrou, predominantemente, uma fraca formação de biofilme em todas os isolados. A motilidade de enxame sob estresse de temperatura foi negativa nas três linhagens, assim como não houve crescimento bacteriano nas duas temperaturas mais altas (41 e 45 °C). Este é o primeiro relato da ocorrência da condição de VBNC e ressuscitação de isolados de *X. citri* pv. *viticola*, bem como a capacidade patogênica neste estado. Assim, ressalta-se a importância da aplicação de um conjunto de técnicas para a detecção mais precisa dessa doença, bem como a pesquisa contínua de outras características, além do biofilme e da motilidade, que possam influenciar nos mecanismos de patogenicidade.

Palavras-chave: VBNC, qPCR, biofilme, motilidade *swarming*

Abstract The bacterial canker of the grapevine, caused by *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Gama et al. 2018, is one of the main pathogens that threaten the Northeast region, which stands out as the largest producer of fine table grapes. The temperature is one of the physical factors that influence the development and survival of the bacteria, influencing the mechanisms of pathogenesis. Thus, the present work evaluated the ability to reach the viable but non-culturable cells (VBNC) state, resuscitation, and infectiveness in this state; as also, as biofilm formation, swarming motility, and pathogenicity under temperature stress of *X. citri* pv. *viticola* strains. First, the growth phases of CCRMXCV17, CCRMXCV80, and CCRMXCV117 strains were determined. The exponential phase was observed at 96 hours for all strains, the death phase at 480 hours for the CCRMXCV17, and 288 hours for the other two strains. The occurrence of the VBNC state was confirmed with the analysis of quantitative polymerase chain reaction (qPCR), as also the artificial inoculation of the strains in the VBNC phase showed no significant interaction between the factors in the final severity (FS) and incubation period (IP). The resuscitation ability was observed in all strains and the CCRMXCV117 strain showed a significant difference between the exponential and VBNC phases. Under the temperature stress, the artificial inoculation presented a significant interaction in final severity between strains and temperatures. Biofilm formation, subjected to temperature stress, showed, predominantly, a weak formation of biofilm in all strains.

Swarming motility under temperature stress was negative in the three strains, as well as there was no bacterial growth at the two highest temperatures (41 and 45 °C). This is the first report confirming the occurrence of the VBNC condition and resuscitation in strains of *X. citri* pv. *viticola*, as well as the pathogenic capacity at this state. Thus, the importance of applying a set of techniques for the more accurate detection of this disease is emphasized, as well as continuous research of other features, beyond biofilm and motility, that can influence the mechanisms of pathogenicity.

Keywords VBNC, qPCR, biofilm, swarming motility

Introduction

Viticulture is present in almost the entire Brazilian territory, concentrated mainly in the south, southeastern, and northeastern regions (Leão & Silva, 2014). In 2022, the northeastern region was responsible for 30.8% of the national grape production and 99% of the table grape exports (COMEXSTAT, 2021; IBGE, 2022). Among the numerous plant diseases that affect the grapevine in this region, the bacterial canker, caused by *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Gama et al. 2018, is a constant threat to production due to its capacity to cause cankers on the twigs, branches, petioles, and veins as also depressed dark lesions on berries (Gama et al., 2018). In addition, *X. citri* pv. *viticola* is considered a quarantine pest present, and it is restricted to the states of Bahia, Ceará, Pernambuco, and Roraima (Regulatory Instruction 38/2018) (MAPA, 2018).

Viable but non-culturable cells (VBNC) is a condition in which bacterial cells are unable to grow in a culture medium but remain alive and capable of resuming their metabolic activities under favorable conditions (Oliver, 2005). Those able to enter this state are usually induced by stress, such as nutritional deficit (Aburjaile et al. 2016), unfavorable pH, extreme temperatures, UV radiation, antibacterial chemical agents derived from copper, and oxidative stress (Su et al., 2016). This dormant-like condition was observed in more than 100 microorganisms (Dong et al. 2020), including bacteria pathogenic to mammals (Amel & Amina, 2008) and also to plants (Bai et al., 2022; Ghezzi and Steck, 1999; Golmohammadi et al., 2013; Kan et al., 2019; Kong et al., 2014; Lucena, 2019; Postnikova et al., 2015). However, most of the work carried out with plant pathogens evaluated the induction of the VBNC mechanism through copper compounds (Golmohammadi et al., 2013; Jiang et al., 2016; Kan et al., 2019a). In turn, the reversal of the VBNC state is known as resuscitation. It occurs through specific conditions such

as a nutrient-rich environment necessary for the survival of the bacteria, which activates metabolic mechanisms (Kan et al., 2019a). In addition, resurrected bacterial cells can regain their culturability and pathogenicity (Bai et al., 2022). However, there is a period of time within a recently entered VBNC-state bacteria can be resuscitated, which is called the “resuscitation window”. Although VBNC cells may still survive, if the resurrection goes beyond this period, the resuscitation ability is lost, and cells die (Dong et al., 2020).

Biofilms are agglomerates of planktonic bacterial cells formed by a matrix of extracellular polysaccharides composed of proteins, nucleic acids, lipids, and other biopolymers which assemble the scaffold of the three-dimensional feature of the biofilm, and enable adhesion to surfaces and the cohesion in the biofilm (Flemming & Wingender, 2010). Due to their protective action against biotic and abiotic factors, biofilms can act as virulence factors in the early stages of infection and colonization. Thus, these coordinated, functional, and highly organized communities provide some phytopathogenic bacterial species with greater virulence and resistance to antimicrobial compounds (Sena-Velez et al., 2015). Guerra et al. (2017) observed the biofilm formation of seven strains of *X. citri* pv. *viticola* which ranged from the non-adherent, weak, moderate, and strong formations. This study found two strains forming a monolayer structure of biofilm, promoted by the cell-surface interactions.

Motility is coordinated by biochemical stimuli, which direct the bacteria to the ideal location for adhesion and clustering on the surface of the host plant, as well as penetration through natural openings or wounds. In this context, some studies have confirmed the association of bacterial motility with the beginning of biofilm formation, as shown in strains of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Sena-Vélez et al., 2015), *Acidovorax citrulli* (Bahar et al., 2010), *Burkholderia cenocepacia* lineages IIIA and IIIB and *B. gladioli* pv. *alliicola* (Silva et al., 2021). Thus, regarding the growth of bacterial cells depends on environmental factors and that temperature is one of the most important factors since it influences the growth, absorption of nutrients, and survival of microorganisms, defining the speed of metabolic reactions (Nascimento et al., 2005), the present study aimed to verify the occurrence of VBNC using quantitative polymerase chain reaction (qPCR) in *X. citri* pv. *viticola*, and evaluate the ability to form biofilm and swarming motility under temperature stress.

Material and methods

Bacterial strains and growth conditions

We used three strains CCRMXCV17, CCRMXCV80, and CCRMXCV117 of *X. citri* pv. *viticola*. The genomes of these strains were sequenced in other studies (Gama et al. 2018) and deposited in the database of the GenBank/NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>), with the assemblies: GCA_016094595.1 (CCRMXCV17), GCA_002564485.1 (CCRMXCV80), and GCA_016094615.1 (CCRMXCV117). All the strains are deposited in Rosa Mariano Culture Collection from the Plant Bacteriology Laboratory (LAFIBAC) of Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). In the different essays carried out in this study, the strains were cultivated in Petri dishes containing NYDA medium (22g L⁻¹ agar, 10g L⁻¹ dextrose, 5g L⁻¹ yeast extract, 3g L⁻¹ meat extract, and 5g L⁻¹ peptone) for 36 h at 29 °C.

Determination of exponential and death phases *in vitro*

The bacterial suspension was prepared for each strain in sterilized distilled water (SDW), adjusting the concentration with the aid of a spectrophotometer (Analyze[®] 500M, São Paulo, Brazil) to OD₅₇₀ = 0.4, which corresponds to 10⁸ colony-forming units (CFU) mL⁻¹. Then, 1.0 mL of the bacterial suspension was added to test tubes containing 9.0 mL of NYD liquid medium (NYDA, without agar), with subsequent incubation at 29°C. For 20 days, every 96 hours, the suspension concentration in the tubes was determined by removing 5.0 mL aliquots of the suspension and reading the absorbance using the spectrophotometer at 570nm. Simultaneously, serial dilutions were performed by removing 1.0 mL aliquots of the suspension and diluting in SDW up to 10⁻⁷. Subsequently, 0.1 mL of the last three dilutions (10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷) was plated in Petri dishes containing NYDA medium and spread using a Drigalski spatula. The colonies formed were counted at 48 hours after plating to determine the concentration of bacterial suspension using the formula CFU mL⁻¹ = average number of colonies x sample dilution factor x correction factor, where the dilution factor corresponds to the potency of base 10 in which the dilution was plated, and the correction factor corresponds to 10, which refers to the fact that only 0.1 mL of suspension was plated. After counting the colonies, concentrations were standardized to 10⁸ CFU mL⁻¹.

The experiment was carried out in a completely randomized design, with four replicates per strain for each day of absorbance reading, where each replicate was characterized by a tube. Bacterial concentration quantifications were performed from each test tube by plating on six Petri dishes for each quantified dilution. The data were used to build growth curves to determine the exponential and death phases. The experiment was performed twice.

Assessment of VBNC status via quantitative PCR (qPCR)

DNA extraction from the strains used in this study was performed using the MiniPrep kit for bacterial genomic DNA extraction (Axygen Biosciences, MA), following the manufacturer's recommendations. The genomic DNA was quantified as previously described (Gama et al., 2011). Three samples were extracted from bacterial growth cultivated in NYDA medium at 29 °C until the exponential, post-exponential, and death phases, which corresponded to 96, 144, and 480 h, for the CCRMXCV17 strain, and 96, 144, and 288 h, for both strains CCRMXCV80, and CCRMXCV117, respectively. Collections were carried out in triplicate.

Each qPCR reaction was composed of 1X GoTaq qPCR Master Mix (2X), 2.5 nM of each primer, and 3 µL of DNA. The primers F' GATCGAAATCCAGATCCGTACC and R' TGCCGCCTTCCTTGTATTT were designed based on the *relA*, synthesized by IDT (Integrated DNA Technologies Inc., San Diego, USA). Line-Gene 9600 Real-Time PCR Detection System from Bioer Technology (Hangzhou, P. R. China) was used, starting the amplification with 2 min at 95 °C, 45 cycles of 15 min at 98 °C, and 1 min at 60 °C. A standard curve was developed based on a 10x serial dilution from 1000 ng/µL. To quantify the number of cells in the exponential, post-exponential, and death phases in the samples, the calculation of the total number of copies/mL was determined from the ratio of the number of base pairs of the *relA* gene x number of base pairs in the genome and the DNA concentration in ng/µL per sample (Lucena, 2019). The cycle limit was determined after manually adjusting the limit number of the linear part of the qPCR logarithmic amplification curves (Aburjaile et al., 2016). Procedures were performed in triplicate for all samples. Samples without the presence of DNA were used to verify the reliability of the data obtained. To determine the VBNC state, the strains were cultured in NYDA medium at 29 °C until the exponential and death phases, and the concentrations in CFU/mL were estimated as described above. The VBNC status was determined by comparing the number of copies/mL of the *relA* gene in the exponential, post-exponential, and death phases with the concentration of total cells in CFU/mL in the suspensions of the strains in the respective phases (Aburjaile et al., 2016), and the values were transformed by multiplying by 10¹⁴. The VBNC status was considered active when the number of copies of the *relA* gene/mL remained high and the concentration of CFU/mL was equal to zero.

The experiment was carried out in a completely randomized design in a factorial arrangement (3 strains x 3 growth phases). The means were submitted to analysis of variance and compared by the LSD test ($P < 0.05$) using the STATISTIX software 9.

VBNC pathological characterization

The strains CCRMXCV17, CCRMXCV80, and CCRMXCV117 were cultivated in 250 mL of NYD medium at 29 °C until the exponential and death phases. Bacterial suspensions were obtained by centrifugation of the NYD medium at 4,500 RPM, followed by removal of the supernatant. The concentration of the bacterial growth precipitated was adjusted in SDW to 10^8 CFU/mL. The strains were inoculated on the four apical leaves of grapevine seedling cv. *Núbia* using the sting and spray method of suspension on the adaxial surface of the leaf blade with the aid of an entomological six-pins set. Leaves similarly treated with SDW were used as a control. After inoculations, the plants were incubated in a greenhouse ($28 \pm 2^\circ\text{C}$, 65% RH) for 14 days, evaluating the incubation period (IP), and the final disease severity (FS), as described by Nascimento (2005).

The experiment was carried out twice, using four repetitions per treatment in the first and second experiments, respectively. Each repetition consisted of a leaf containing six inoculation points along the midrib main veins. The experiment was carried out in a completely randomized design in a factorial arrangement (3 strains x 2 growth phases). The means were submitted to analysis of variance and compared by the LSD test ($P < 0.05$) using the STATISTIX software 9.

Resuscitation *in vitro*

The strains CCRMXCV17, CCRMXCV80, and CCRMXCV117 were cultivated in 10 mL of NYD medium at 29 °C until reaching the exponential and death phases, which were determined in the first experiment. Subsequently, 1.0 mL of bacterial suspension was added to test tubes containing 9.0 mL of NYD liquid medium, with subsequent incubation at 29°C. After 48 hours, serial dilutions were performed by removing 1.0 mL aliquots of the suspension and diluting in SDW up to 10^{-6} . Subsequently, 0.1 mL of the last two dilutions (10^{-5} , 10^{-6}) was plated in Petri dishes containing NYDA medium and spread using a Drigalski spatula. The colonies formed were counted 48 hours after plating to determine the concentration of bacterial suspension as previously described.

The experiment was carried out in a completely randomized design, with four replicates per strain for each phase, where each replicate was characterized by a tube. Bacterial concentration quantifications were performed from each test tube by plating on eight Petri dishes for each quantified dilution. The data were submitted to the Independent Two-Sample

T-test ($P < 0.05$) using the STATISTIX software 9. The experiment was performed twice.

Biofilm formation *in vitro* under temperature stress

Sterile flat-bottom 96-well polystyrene microplates (Kasvi inc.) were used to evaluate biofilm formation using two different liquid culture media: Luria-Bertani (LB) (10 g L⁻¹ tryptone, 5 g L⁻¹ yeast extract, 5 g L⁻¹ NaCl) and KADO (10 g L⁻¹ sucrose, 8 g L⁻¹ hydrolyzed acid casein, 4 g L⁻¹ yeast extract, 2 g L⁻¹ K₂HPO₄, 0.3 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O), according to the protocol adapted from Antunes et al. (2010). Each well was filled with 140 µL of culture medium, 20 µL of Milli-Q water, and 40 µL of bacterial suspension (OD₅₇₀=0.4). The negative control consisted of SDW replacing the bacterial suspension. The plates were incubated for 36 hours at the respective heat stress temperatures (29, 33, 37, 41, and 45 °C). Then, the contents of the wells were removed and washed three times with 200 µL of sterile 0.9% NaCl solution. Soon after, the plates were placed in an oven at 60 °C, and the biofilm was fixed for 1 hour. Subsequently, the adhered layer of cells was stained with 200 µL of 0.4% crystal violet for 15 minutes at room temperature, and then the plate was washed with distilled water. In each well, the biofilm was solubilized with 200 µL of ethanol (99.5%) for 15 minutes with the lid closed to avoid evaporation. Biofilm quantification was performed using a microplate reader (Synergy H1 Microplate Reader, Biotek, Winooski, VT, USA), at OD_{570nm}.

The biofilm formation ability of *X. citri* pv. *viticola* strains was established as per Stepanović et al (2000). The negative control (OD_C) was used as a basis to classify the biofilm formation for each strain (OD) in different culture media, according to the following criteria: OD ≤ OD_C = non-adherent, OD_C ≤ OD ≤ (2 × OD_C) = weak biofilm former, (2 × OD_C) ≤ OD ≤ (4 × OD_C) = moderate former, and (4 × OD_C) ≤ OD = strong former. The experiment was designed in a factorial arrangement of 5 × 3 for each culture media (five temperatures and three bacterial strains for each culture media). The experiment was carried out in duplicate, containing six biological replicates each.

Swarming motility under temperature stress

The strains were analyzed according to Rashid and Korneberg (2000), with modifications. Thus, 10 µL of bacterial suspension were deposited in the center of Petri dishes containing 15 mL of motility culture medium (10 g L⁻¹ tryptone, 5 g L⁻¹ NaCl, and 5 g L⁻¹ agar) and incubated at stress temperatures (29, 33, 37, 41 and 45 °C). Colony diameter was measured

after 72 hours of incubation. The experiment was conducted with six replications and repeated twice.

Pathological characterization under temperature stress

The strains CCRMXCV17, CCRMXCV80, and CCRMXCV117 were cultivated in 250 mL of NYD medium at the respective heat stress temperatures (29, 33, 37, 41, and 45 °C) and incubated for 48 hours. Bacterial suspensions were obtained by centrifugation of the NYD medium at 4,500 RPM, followed by removal of the supernatant. The concentration of the bacterial growth precipitated was adjusted in SDW to 10^8 CFU/mL. The strains were inoculated on the four apical leaves of grapevine seedling cv. *Núbia* using the sting and spray method of suspension on the adaxial surface of the leaf blade with the aid of an entomological six-pins set. Leaves similarly treated with SDW were used as a control. After inoculations, the plants were incubated in a greenhouse ($28 \pm 2^\circ\text{C}$, 65% RH) for 14 days, evaluating the incubation period (IP), and the final disease severity (FS), as described by Nascimento (2005).

The experiment was carried out twice, using four repetitions per treatment in the first and second experiments, respectively. Each repetition consisted of a leaf containing six inoculation points along the midrib main veins. The experiment was carried out in a completely randomized design in a factorial arrangement (3 strains x 5 temperatures). The means were submitted to factorial analyses and compared by the LSD test ($P < 0.05$) using the STATISTIX software 9.

Results

In vitro growth phases

All three strains of *X. citri* pv. *viticola* started the exponential phase at 96 h, reaching concentrations of 0.65, 0.2, and 0.3×10^8 CFU/mL, and for the death phase, the absence of bacterial growth was observed at 480, 288, and 288 h for the strains CCRMXCV17, CCRMXCV80, and CCRMXCV117, respectively (Fig. 1a). In turn, the growth curves obtained from the absorbance of the suspension of the three strains showed progressive increases up until 192 h, followed by a continuous decrease (Fig. 1b).

VBNC state evaluation

The data obtained through qPCR showed that the primers built based on the *relA* gene efficiently amplified all the samples used (Table 1). No significant interactions ($P>0.05$) were observed between the factors phase and strains, and no significant difference was observed in the factor phase singly. However, the strain CCRMXCV117 presented a higher number of copies/mL, 20.3×10^{14} , compared with CCRMXCV17 and CCRMXCV80, which were 9.83 and 7.26×10^{14} ($P<0.05$), respectively (Table 2).

VBNC pathological characterization

For the variable final disease severity (FS), there was no significant interaction ($P>0.05$) between the factors strains and bacterial growth phases. In addition, no significant differences were found within the factors analyzed singly.

Similarly, the variable incubation period (IP) showed no significant interaction ($P>0.05$) between the strains and bacterial growth phases, and no significant difference was observed between the phases. However, the IP of the CCRMXCV80 strain was significantly higher than the strains CCRMXCV17 and CCRMXCV17 (Table 3).

Resuscitation *in vitro*

All the strains showed resurrection potential after reaching the VBNC state. For the strains CCRMXCV17, CCRMXCV80, and CCRMXCV117 were observed 0.2 and 0.29, 0.27 and 0.33, and 0.29 and 0.062×10^8 CFU/mL at the exponential phase and VBNC state, respectively (Fig. 2).

Biofilm formation *in vitro* under temperature stress

All tested strains could adhere to the inert surface and form biofilms in both culture media under temperature stress (Figs. 3a and 3b). However, only the weak level among the others (non-adherent, weak, moderate, and strong) was observed predominantly. The only exception was shown at 33 °C in the strain CCRMXCV117, which was classified as non-adherent in LB medium.

Regarding LB media, it was observed a significant interaction ($P<0.05$) between the factors strains and temperature. Among the strains cultivated on LB media, the CCRMXCV117

showed a significant difference ($P<0.05$) in the higher temperatures (37, 41, and 45 °C). Similarly, we also observed a significant difference in temperatures of 37 and 41 °C for the CCRMXCV80 strain. However, a significant difference in the CCRMXCV17 strain was only observed at 37 °C (Table 4). Still, in the same culture media, at 29 °C was observed a significant difference between CCRMXCV117 and the other two strains. At 33 °C, it was noticed a significant difference between the strains CCRMXCV17 and CCRMXCV117. However, at 37 °C, only the CCRMXCV17 strain showed a significant difference from the other strains. In contrast, at 41 and 45 °C, only the CCRMXCV117 differed significantly from the others.

Similarly, in the culture media KADO, a significant interaction ($P<0.05$) between the factors strains and temperatures was observed (Table 5). Solely the CCRMXCV17 showed a significant difference at 33 °C between the others. Likewise, this same temperature was the only one that differed significantly in the CCRMXCV17 from the other strains. The remaining temperatures did not differ significantly among strains.

Swarming motility under temperature stress

The swarming feature was not detected in *X. citri* pv. *viticola* strains, since a negative response corresponds to a colony growth restricted to the center of the Petri dish. A positive result for swarming motility would be, after 72 hours of incubation, the exhibition of an increase in colony diameter distinguished by circular, flat elevation and edges ranging from smooth to rough. However, the analyses revealed significant differences ($P<0.05$) in the colony size of the strain under the temperatures (Fig. 4). For the CCRMXCV17 strain, it was observed a significant difference only at 37 °C, while at 29 and 33 °C did not differ. On the other hand, the CCRMXCV80 strain showed no significant difference between the subjected temperatures. Regarding the strain CCRMXCV117, all the temperatures differ significantly in the colony size. Nevertheless, no colony growth was observed in the strains when submitted at 41 and 45 °C.

Pathological characterization under temperature stress

There was no significant interaction ($P>0.05$) for IP between the factors strains and temperatures, and no significant differences were found within the factors analyzed singly. On the other hand, for the FS, it was observed a significant interaction ($P<0.05$) between the factors strains and temperatures (Table 6). The CCRMXCV17 strain showed no differences in the heat stress, while CCRMXCV80 presented a significant difference at 29 and 37 °C from the different

temperatures, and the CCRMXCV117 strain showed significant difference with all temperatures. In contrast, among the temperatures evaluated, at 29 °C was observed a significant difference in FS of CCRMXCV17, as also at 37 °C. At 33 °C, only the CCRMXCV117 showed a significantly higher FS among the other strains. When submitted to the higher temperatures, 41 and 45 °C, the strains did not differ.

Discussion

The *in vitro* growth curve built using the CCRMXCV17, CCRMXCV80, and CCRMXCV117 strains of *X. citri* pv. *viticola* satisfactorily allowed the determination of the exponential and death phases (Fig. 1), which were used to assess the VBNC state. Throughout the growth curve, the behavior observed was variable peaks in all strains.

Regarding the exponential phase, all three strains presented their beginning at 96 h, with a peak at 192 h also. However, for the death phase, it was observed similarity between the strains CCRMXCV80 and CCRMXCV117 in which both ceased their colony formation at 288 h, while the strain CCRMXCV17 started to show no growth at 480 h. When the bacterial concentration reached zero, the optical density curve of the bacterial suspensions followed the growth curve until experiments were completed.

To prove the occurrence of the VBNC state in *X. citri* pv. *viticola*, the gene *relA* was selected for the design of the primers because it is a gene previously successfully used to detect the VBNC phase in strains of *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* (Lucena, 2019) and *Vibrio cholerae* strains (González-Escalona et al., 2006), being responsible for both the synthesis and degradation of guanosine pentaphosphate synthetase [(p)ppGpp]. Furthermore, (p)ppGpp also promotes resistance to adverse conditions such as nutritional stress, antibiotics, and metabolic inhibitors (Asakura et al., 2007).

All samples from the exponential, post-exponential, and death phases amplified many copies of the *relA* gene (Table 1). The same gene has been amplified to understand its role in VBNC state in *X. campestris* pv. *campestris* by Bai et al. (2021). Even though analyses via qPCR showed no significant interaction ($P>0.05$) between the factors phase and strain, these results indicate an active cell multiplication even after the estimated time for cell death, demonstrating for the first time the occurrence of this mechanism in *X. citri* pv. *viticola*. These data indicated the ability of this bacterium to enter this state is stimulated by the time of cultivation of its cells and showed a significant difference between strains (Table 2). Furthermore, in the genus *Xanthomonas*, the occurrence of VBNC has been previously reported

in *X. citri* pv. *anacardii* (Lucena, 2019), *X. citri* subsp. *citri* (Golmohammadi et al., 2013) and in *X. campestris* pv. *campestris* (Ghezzi & Steck, 1999), evidencing the frequent presence of this mechanism in this genus.

The artificial inoculations of the strains CCRMXCV17, CCRMXCV80, and CCRMXCV117 in grapevine plants, at exponential phase and VBNC state, presented the disease symptoms at both phases. However, no significant interactions between the factors were observed, nor did the factors separately obtain significant differences in the final severity. Therefore, these results confirm the infectivity of these strains of *X. citri* pv. *viticola* at VBNC condition, which is similarly found in *X. citri* pv. *anacardii* (Lucena, 2019), *Acidovorax citrulli* (Kan et al., 2019b), *X. citri* pv. *citri* (Del Campo et al., 2009). Furthermore, a “resuscitation window” was observed for all three strains, which showed culturability on a fresh new culture medium. This occurrence corroborates the fact that there were viable cells in the death phase and their ability to resuscitate into a culturable state under favorable conditions, as described by Dong et al. (2020). There was no significant difference ($P>0.05$) between the exponential phase and VBNC state for the CCRMXCV17 and CCRMXCV80 strains, which shows the ability of resurrection of these strains. Although, the strain CCRMXCV117 showed a significant difference in the colony-formation unit between its exponential phase and VBNC condition, which were 0.29 and 0.062×10^8 CFU/mL, respectively, still it was able to resuscitate when submitted into new culture media.

The formation was predominantly weak regarding biofilm adherence under temperature stress in both LB and KADO culture mediums. Different from the results obtained by Guerra et al. (2017), in which other strains of *X. citri* pv. *viticola* were tested, and the results obtained ranged from strong, moderate, weak to non-adherent. The variability could explain this among strains of the same pathovar, also observed by Guerra et al., (2017). Still, the most significant difference was observed among the strains cultivated on LB media, in which the CCRMXCV117 showed a significant difference ($P<0.05$) in the higher temperatures (37, 41, and 45 °C). This could be related to the influence that temperature can exercise on the environment, and so, on the development of the bacteria, more specifically, its metabolic reactions and pathogenic mechanisms, such as biofilm formation (Sena-Vélez et al., 2015).

Swarming motility was confirmed as negative since the strains did not present the characteristics of an increase in colony diameter after 72 h of incubation, characterized as circular, flat elevation, with edges that varied from smooth to rough, as observed by Silva et al. (2021) in strains of *B. cenocepacia* lineages IIIA and IIIB and *B. gladioli* pv. *alliicola*. Bacterial motility is necessary for entry into stomata or wounds, and the flagella movement allows the

bacteria to locate specific sites for adhesion, therefore, it is involved in the first stages of biofilm formation, which is a key to disease development in *Xanthomonas* species (Felipe et al., 2018; Sena-Vélez et al., 2015). The strains of *X. citri* pv. *viticola* analyzed showed negative swarming motility, which corroborates the results of weak biofilm formation since the initiation process of biofilm formation is linked to the motility ability of the bacterium (Felipe et al., 2018).

The artificial inoculations under temperatures stress were successful, confirming the occurrence of bacterial canker even under high temperatures, which already occurs naturally in the fields. The significant interaction ($P < 0.05$) between the strains and temperatures demonstrated the effect this environmental factor has on the disease's final severity. Its influence at 29, 33, and 37 °C resulted in significant differences among the strains. Plant pathogenic bacteria can survive and multiply epiphytically, under the surface of the host plant, within the optimal growth range, however, they must deal with fluctuations in the temperature conditions (Janse, 2005). At the vineyards, *X. citri* pv. *viticola* can survive epiphytically on asymptomatic vine plants and on alternative hosts, as well as, is able to survive on crop residues for up to 80 days in high populations (Silva et al., 2012).

Allied to it, the high number of copies/ml of the *relA* gene in the death phase of the bacterial growth curve demonstrated the occurrence of the VBNC state in strains of *X. citri* pv. *viticola*. The strains CCRMXCV17, CCRMXCV80, and CRMXCV117 demonstrated strong infectivity in grapevine leaves during this phase, comparable to the exponential phase, suggesting the likelihood of the pathogen spreading in propagation materials. The significant results found in biofilm optical density and swarming motility submitted to the stress showed the relevant influence that temperature could exercise on the bacteria mechanisms of pathogenicity.

Lima (2000) reported the influence of high temperatures and relative air humidity on the disease development and, combined with the rainy season, can increase the severity and speed the dissemination of the pathogen at the Northeastern vineyards. Evaluating the interactions between temperatures and the bacteria features, such as biofilm formation, motility, and pathogenicity, can help to understand and identify the mechanisms that uphold these bacteria to cause grapevine canker. In parallel to these findings, conventional methods of diagnostics may underestimate the survivability of the bacteria that can be detected or even fail to detect the existence of the pathogen when employed alone. The results of this study suggest that conventional and molecular methods should be combined to detect *X. citri* pv. *viticola* in grapevine more precisely, as well as other bacterial features which can influence the mechanisms of pathogenicity, beyond biofilm and motility, should be investigated.

Author contribution Conceptualization: all authors. Methodology: FPC, LPL. Formal analysis and investigation: FPC, FFA, and MASG. Writing: FPC, EBS, AMB, FFA, and MASG.

Acknowledgments FPC acknowledges the Brazilian Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the scholarship awarded, and the Phytosanitary Clinique of Pernambuco (CLIFIPE-UFRPE) for providing some laboratory equipment and facilities (support of FACEPE APQ-0519-5.01/19).

Data availability The data supporting this study's findings are available from the corresponding author upon reasonable request.

Declarations

Ethics approval This article does not contain any experiments on human participants or animals.

Conflict of Interest The authors declare no conflict of interest.

References

- Aburjaile, F. F., Madec, M. N., Parayre, S., Miyoshi, A., Azevedo, V., Le Loir, Y., & Falentin, H. (2016). The long-term survival of *Propionibacterium freudenreichii* in a context of nutrient shortage. *Journal of Applied Microbiology*, 120(2), 432–440. <https://doi.org/10.1111/JAM.13000>
- Aburjaile, Flavia Figueira, Rohmer, M., Parrinello, H., Maillard, M. B., Beaucher, E., Henry, G., et al. (2016). Adaptation of *Propionibacterium freudenreichii* to long-term survival under gradual nutritional shortage. *BMC Genomics*, 17(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3367-x>
- Amel, D., & Amina, B. (2008). Resuscitation of Seventeen-year Stressed *Salmonella typhimurium*. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 37(1), 69–82. <https://doi.org/10.2478/v10009-007-0038-x>
- Antunes, A. L. S., Trentin, D. S., Bonfanti, J. W., Pinto, C. C. F., Perez, L. R. R., Macedo, A. J., & Barth, A. L. (2010). Application of a feasible method for determination of biofilm antimicrobial susceptibility in staphylococci. *APMIS*, 118(11), 873–877. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2010.02681.x>
- Asakura, H., Ishiwa, A., Arakawa, E., Makino, S., Okada, Y., Yamamoto, S., & Igimi, S. (2007). Gene expression profile of *Vibrio cholerae* in the cold stress-induced viable but non-culturable state. *Environmental Microbiology*, 9(4), 869–879. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01206.x>

- Bahar, O., De La Fuente, L., & Burdman, S. (2010). Assessing adhesion, biofilm formation and motility of *Acidovorax citrulli* using microfluidic flow chambers. *FEMS Microbiology Letters*, 312(1), 33–39. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02094.x>
- Bai, K., Chen, X., Kan, Y., Jiang, N., Li, J., & Luo, L. (2022). Evaluation of optimal reference genes for the normalization by qPCR in viable but nonculturable state in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Journal of Phytopathology*, 170(6), 399–407. <https://doi.org/10.1111/jph.13089>
- Bai, K., Yan, H., Chen, X., Lyu, Q., Jiang, N., Li, J., & Luo, L. (2021). The Role of RelA and SpoT on ppGpp Production, Stress Response, Growth Regulation, and Pathogenicity in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Microbiology Spectrum*, 9(3). <https://doi.org/10.1128/spectrum.02057-21>
- COMEXSTAT. (2021). Sistema de Estatísticas do Comércio Exterior. Exportação e importação geral. <http://comexstat.mdic.gov.br/pt/comex-vis>. Accessed 4 June 2021
- da Silva, P. H. R., de Assunção, E. F., da Silva Velez, L., dos Santos, L. N., de Souza, E. B., & da Gama, M. A. S. (2021). Biofilm formation by strains of *Burkholderia cenocepacia* lineages IIIA and IIIB and *B. gladioli* pv. *alliiicola* associated with onion bacterial scale rot. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(4), 1665–1675. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00564-6>
- Del Campo, R., Russi, P., Mara, P., Mara, H., Peyrou, M., De León, I. P., & Gaggero, C. (2009). *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* enters the VBNC state after copper treatment and retains its virulence. *FEMS Microbiology Letters*, 298(2), 143–148. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01709.x>
- Dong, K., Pan, H., Yang, D., Rao, L., Zhao, L., Wang, Y., & Liao, X. (2020). Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(1), 149–183. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12513>
- Felipe, V., Romero, A. M., Montecchia, M. S., Vojnov, A. A., Bianco, M. I., & Yaryura, P. M. (2018). *Xanthomonas vesicatoria* virulence factors involved in early stages of bacterial spot development in tomato. *Plant Pathology*, 67(9), 1936–1943. <https://doi.org/10.1111/ppa.12905>
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Gama, Marco Aurélio Siqueira da, Mariano, R. D. L. R., Silva Júnior, W. J. da, Farias, A. R. G. de, Barbosa, M. A. G., Ferreira, M. Á. da S. V., et al. (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 Pa. *Phytopathology*, 108(10), 1143–1153. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-18-0037-R>
- Gama, M. A. S., Mariano, R. L. R., Viana, F. M. P., Ferreira, M. A. S. V., & Souza, E. B. (2011). Polyphasic characterization of pigmented strains of *Xanthomonas* pathogenic to cashew trees. *Plant Disease*, 95(7), 793–802. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-10-0321>

- Ghezzi, J. I., & Steck, T. R. (1999). Induction of the viable but non-culturable condition in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in liquid microcosms and sterile soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 30(3), 203–208. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00648.x>
- Golmohammadi, M., Cubero, J., López, M. M., & Llop, P. (2013). The viable but non-culturable state in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* is a reversible state induced by low nutrient availability and copper stress conditions. *Journal of Life Sciences*, 7(10), 1019–1029. https://www.researchgate.net/publication/260192098_The_viable_but_non-culturable_state_in_Xanthomonas_citri_subsp_citri_is_a_reversible_state_induced_by_low_nutrient_availability_and_copper_stress_conditions
- González-Escalona, N., Fey, A., Höfle, M. G., Espejo, R. T., & Guzmán, C. A. (2006). Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis of *Vibrio cholerae* cells entering the viable but non-culturable state and starvation in response to cold shock. *Environmental Microbiology*, 8(4), 658–666. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00943.x>
- Guerra, M. L., Malafaia, C. B., Macedo, A. J., Silva, M. V., Mariano, R. L. R., & Souza, E. B. (2017). Biofilm formation by *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* affected by abiotic surfaces and culture media. *Tropical Plant Pathology*, 43(2), 146–151. <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0190-0>
- IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). (2022). Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA. <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado>. Accessed 8 July 2022
- Janse, J. D. (2005). *Phytopathology: principles and practice*. Wageningen, The Netherlands: CABI Publishing. <https://doi.org/10.1079/9781845930257.0000>
- Jiang, N., Lv, Q. Y., Xu, X., Cao, Y. S., Walcott, R. R., Li, J. Q., & Luo, L. X. (2016). Induction of the viable but nonculturable state in *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and in planta resuscitation of the cells on tomato seedlings. *Plant Pathology*, 65(5), 826–836. <https://doi.org/10.1111/PPA.12454>
- Kan, Y., Jiang, N., Xu, X., Lyu, Q., Gopalakrishnan, V., Walcott, R., et al. (2019a). Induction and Resuscitation of the Viable but Non-culturable (VBNC) State in *Acidovorax citrulli*, the Causal Agent of Bacterial Fruit Blotch of Cucurbitaceous Crops. *Frontiers in Microbiology*, 0(MAY), 1081. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01081>
- Kan, Y., Jiang, N., Xu, X., Lyu, Q., Gopalakrishnan, V., Walcott, R., et al. (2019b). Induction and Resuscitation of the Viable but Non-culturable (VBNC) State in *Acidovorax citrulli*, the Causal Agent of Bacterial Fruit Blotch of Cucurbitaceous Crops. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAY), 1081. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01081>
- Kong, H. G., Bae, J. Y., Lee, H. J., Joo, H. J., Jung, E. J., Chung, E., & Lee, S. W. (2014). Induction of the viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* by low temperature in the soil microcosm and its resuscitation by catalase. *PLoS ONE*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109792>
- Leão, P. C. D., & Silva, D. J. (2014). Cultivo da videira no semiárido brasileiro. In R. Pio (Ed.), *Cultivo de fruteiras de clima temperado em regiões subtropicais e tropicais* (1st ed., pp.

- 578–618). Lavras: UFLA. <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1006644>
- Lima, M. F. (2000). Cancro bacteriano da videira, causado por *Xanthomonas campestris* pv. viticola: Epidemiologia e Manejo. *Circular Técnica da Embrapa Semi-Árido*, 54, 23.
- Lucena, L. P. de. (2019). *Caracterização de células viáveis e não cultiváveis em Xanthomonas citri* pv. *anacardii*. Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- MAPA (Ministério da Agricultura, P. e A. (2018). Planos Nacionais de Prevenção e Vigilância - Pragas Quarentenárias Ausentes — Português (Brasil). <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/sanidade-vegetal/planos-de-contingencia-pragas-ausentes>. Accessed 24 March 2019
- 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(6), 650–654.
- Oliver, J. D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *The Journal of Microbiology*. The Microbiology Society of Korea.
- Postnikova, O. A., Shao, J., Mock, N. M., Baker, C. J., & Nemchinov, L. G. (2015). Gene expression profiling in viable but nonculturable (VBNC) cells of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Frontiers in Microbiology*, 6(DEC), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01419>
- Rashid, M. H., & Kornberg, A. (2000). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(9), 4885–4890. <https://doi.org/10.1073/PNAS.060030097/ASSET/10EC45BC-1B89-4F0F-8392-EC1DDDB74F12/ASSETS/GRAPHIC/PQ0600300005.JPEG>
- Sena-Velez, M., Redondo, C., Gell, I., Ferragud, E., Johnson, E., Graham, J. H., & Cubero, J. (2015). Biofilm formation and motility of *Xanthomonas* strains with different citrus host range. *Plant Pathology*, 64, 767–775. <https://doi.org/10.1111/ppa.12311>
- Sena-Vélez, M., Redondo, C., Gell, I., Ferragud, E., Johnson, E., Graham, J. H., & Cubero, J. (2015). Biofilm formation and motility of *Xanthomonas* strains with different citrus host range. *Plant Pathology*, 64(4), 767–775. <https://doi.org/10.1111/ppa.12311>
- Silva, A. M. F., de Menezes, E. F., de Souza, E. B., de Melo, N. F., & Mariano, R. de L. R. (2012). Sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. viticola em tecido infectado de videira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 34(3), 757–765. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452012000300015>
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175–179. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6)
- Su, X., Guo, L., Ding, L., Qu, K., & Shen, C. (2016). Induction of viable but nonculturable state in rhodococcus and transcriptome analysis using RNA-seq. *PLoS ONE*, 11(1), e0147593. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147593>

Table 1 Comparative qPCR amplification and cell formation units of strains of *X. citri* pv. *viticola* at exponential, post-exponential, and death phases

Strains	Phase	10 ⁸ CFU/mL	10 ¹⁴ Copies/mL <i>relA</i>
CCRMXCV17	Exponential	0.65	10.80
	Post-exponential	0.08	7.67
	Death	0.00	11.10
CCRMXCV80	Exponential	0.20	6.45
	Post-exponential	0.19	4.77
	Death	0.00	10.60
CCRMXCV117	Exponential	0.30	14.60
	Post-exponential	1.07	26.66
	Death	0.00	19.80

Table 2 Comparative between the strains of *X. citri* pv. *viticola* evaluated per number of copies/mL of the gene *relA* amplified by qPCR

Strains	10¹⁴ Copies/mL <i>relA</i>
CCRMXCV17	9.83 b ¹
CCRMXCV80	7.26 b
CCRMXCV117	20.3 a
	C.V. (%) 32.21

¹Means followed by the same letter do not differ significantly from each other by Fisher's LSD test (P>0.05).

C.V. coefficient of variation

Table 3 Characterization of the incubation period (IP) after 14 days of inoculation of CCRMXCV17, CCRMXCV80, and CCRMXCV117 strains of *X. citri* pv. *viticola*

Strains	Incubation period (days)
CCRMXCV17	4.5 a ¹
CCRMXCV80	3.5 b
CCRMXCV117	3.25 b
	C.V. (%) 8.43

¹Means followed by the same letter do not differ significantly from each other by Fisher's LSD test (P>0.05).

C.V. coefficient of variation

Table 4 Interaction between temperature stress on LB media and strains of *Xanthomonas citri* pv. *viticola* in biofilm formation on inert surfaces

Temperature	CCRMXCV17	CCRMXCV80	CCRMXCV117
29 °C	0.116 ^x bA ^y	0.114 abA	0.102 bB
33 °C	0.119 bA	0.110 bAB	0.102 bB
37 °C	0.138 aA	0.123 aB	0.124 aB
41 °C	0.115 bB	0.120 aAB	0.128 aA
45 °C	0.111 bB	1.117abAB	0.122 aA
C.V. (%) 10.53			

^xOptical density

^yAverages of twelve repetitions obtained from two independent experiments. Means followed by the same lowercase letter(s) in column and uppercase in line do not differ significantly from each other by Fisher's LSD test ($P>0.05$).

C.V. coefficient of variation

Table 5 Interaction between temperature stress on KADO media and strains of *Xanthomonas citri* pv. *viticola* in biofilm formation on inert surfaces

Temperature	CCRMXCV17	CCRMXCV80	CCRMXCV117
29 °C	0.140 bA	0.112 aA	0.131 aA
33 °C	0.184 aA	0.108 aB	0.115 aB
37 °C	0.129 bA	0.126 aA	0.124 aA
41 °C	0.112 bA	0.110 aA	0.110 aA
45 °C	0.114 bA	0.111 aA	0.123 aA

C.V. (%) = 31.977

^xOptical density

^yAverages of twelve repetitions obtained from two independent experiments. Means followed by the same lowercase letter(s) in column and uppercase in line do not differ significantly from each other by Fisher's LSD test ($P>0.05$).

C.V. coefficient of variation

Table 6 Interaction between temperature stress and strains of *Xanthomonas citri* pv. *viticola* evaluated through the final severity of grapevine bacterial canker

Temperature	Final severity (%)		
	CCRMXCV17	CCRMXCV80	CCRMXCV117
29 °C	2.5 ^x aB ^y	7.0 aA	6.0 abA
33 °C	2.5 aB	2.0 bB	7.0 aA
37 °C	2.0 aB	6.0 aA	7.0 aA
41 °C	3.0 aA	2.5 bA	3.5 cA
45 °C	3.0 aA	3.5 bA	4.0 cbA
	C.V. (%) 34.68		

^xFinal severity (%)

^yMeans followed by the same lowercase letter(s) in column and uppercase in line do not differ significantly from each other by Fisher's LSD test (P>0.05).

C.V. coefficient of variation

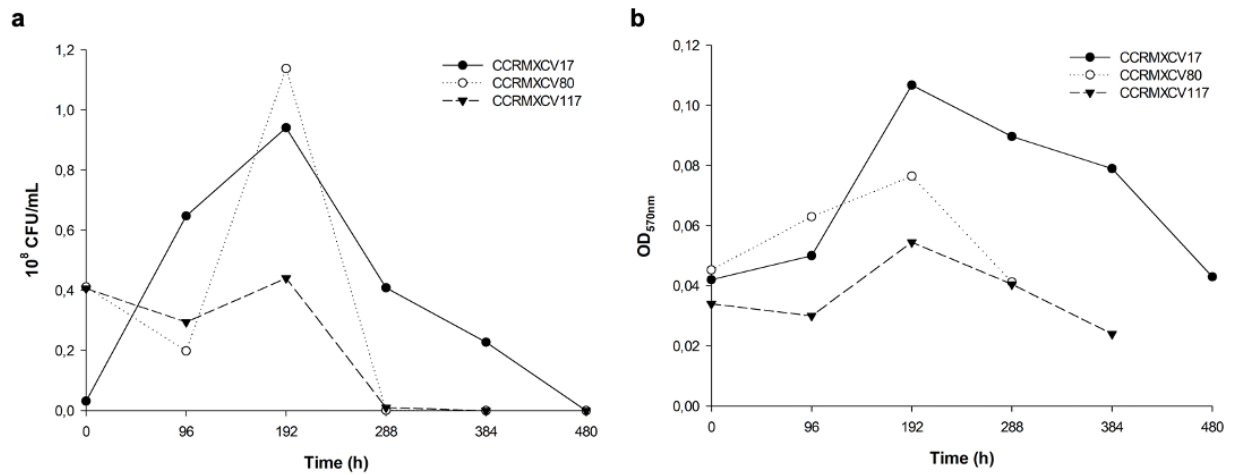


Fig. 1 Growth curves of CCRMXCV17, CCRMXCV80, and CCRMXCV117 strains of *Xanthomonas citri* pv. *viticola*. **a**, Bacterial cell concentration *in vitro*. **b**, Bacterial optical density *in vitro* over time

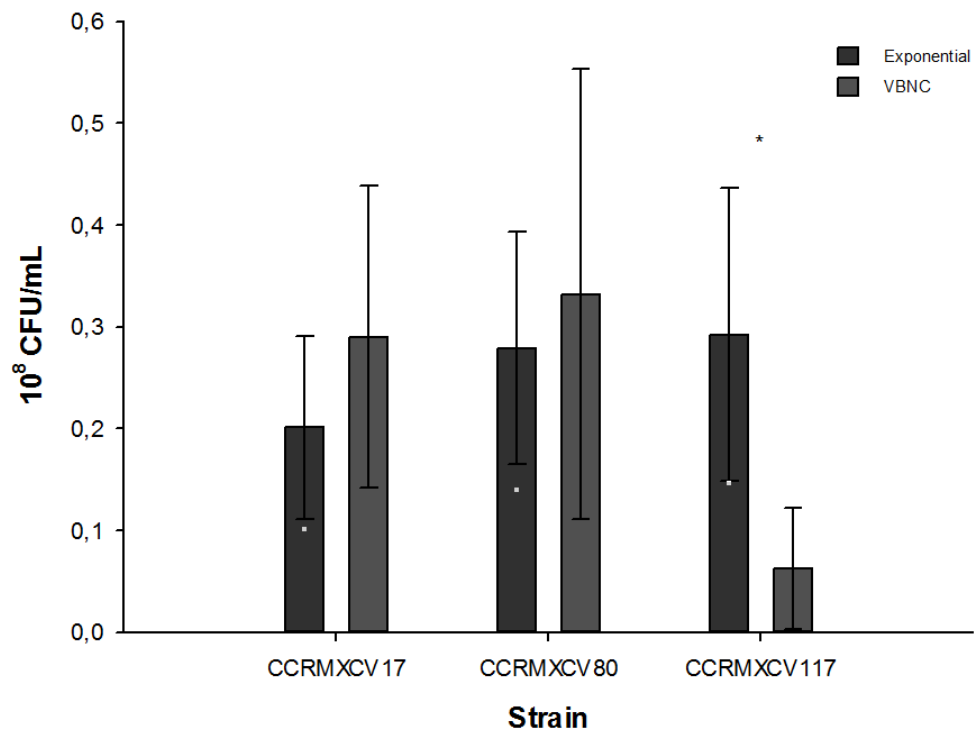


Fig. 2 Bacterial cell concentration after the resurrection *in vitro* of the strains CCRMXCV17, CCRMXCV80, and CCRMXCV117 of *Xanthomonas citri* pv. *viticola*

*Significant difference ($P < 0.05$)

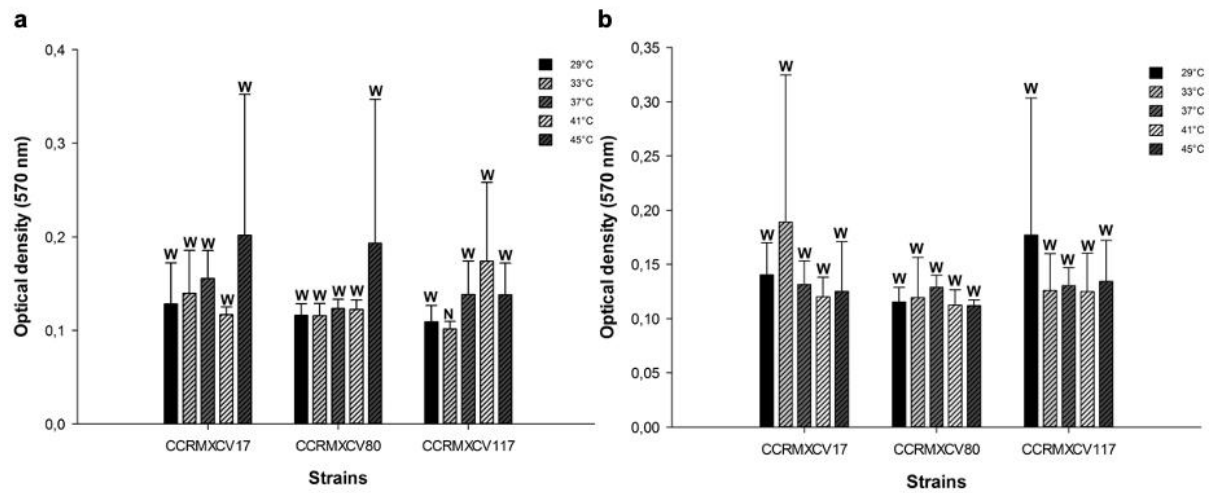


Fig. 3 Biofilm formation ability under temperature stress by the strains of *X. citri* pv. *viticola* on polystyrene microtiter plates. **a**, liquid culture media: Luria-Bertani (LB). **b**, liquid culture media: Kado 523 (KADO). Bars indicate mean values from twelve replicates obtained from independent experiments; the error bar represents the standard deviation (SD). N, non-adherent; W, weak

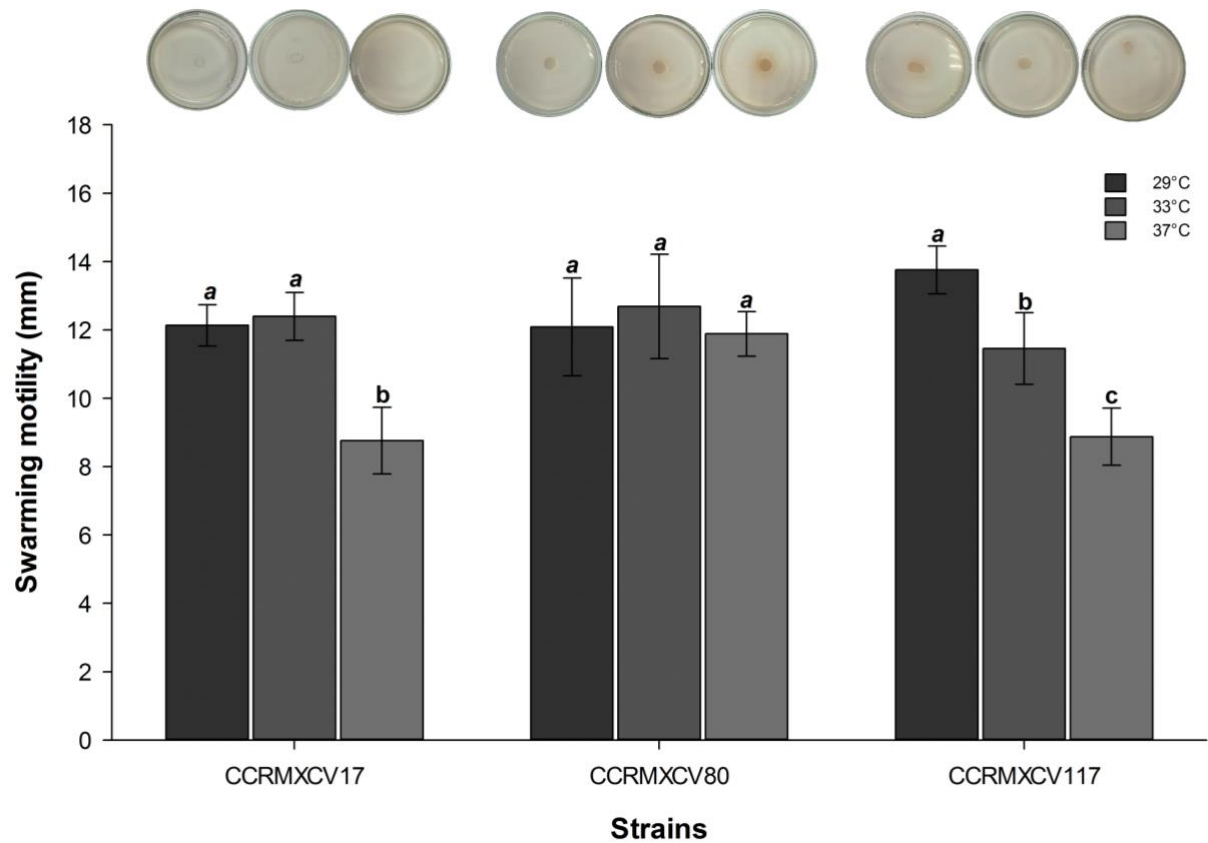


Fig. 4 Swarming motility under temperature stress of *X. citri* pv. *viticola* strains. Bars indicate mean values from five replicates obtained from one independent experiment, error bar represents the standard deviation (SD). Bars labeled with different letters are significantly different according to Fisher's LSD test ($P < 0.05$)

CAPÍTULO III



Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

O gene *relA* foi eficiente para a quantificar o número de cópias/mL, em qPCR, dos isolados de *X. citri* pv. *viticola* em fase de morte, indicando a ocorrência de células viáveis, mas não cultiváveis nesta espécie.

A capacidade de ressuscitação dos isolados de *X. citri* pv. *viticola* quando inoculadas em um novo meio de cultura favorável, demonstra a habilidade da espécie em sair do estado de VBNC e torna-se viável novamente.

A patogenicidade dos isolados de *X. citri* pv. *viticola* em fase de VBNC, comprovaram a viabilidade do inóculo.

A formação de biofilme classificada como fraca e o teste negativo para motilidade *swarming*, ambos sob estresse térmico indicaram que outros mecanismos bacterianos estão envolvidos na patogenicidade de *X. citri* pv. *viticola* às videiras.

A ocorrência da condição de VBNC e ressuscitação em isolados de *X. citri* pv. *viticola*, assim como a capacidade patogênica nesta fase, indicam a necessidade de aplicação de um conjunto de técnicas para a detecção mais precisa desta doença.