



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

**Caracterização de células viáveis e não cultiváveis em
Xanthomonas citri pv. *anacardii***

Lucas Pontes de Lucena

**RECIFE-PE
JULHO – 2019**

LUCAS PONTES DE LUCENA

**CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS E NÃO CULTIVÁVEIS EM
Xanthomonas citri pv. *anacardii***

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

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

**RECIFE-PE
JULHO – 2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

L935c Lucena, Lucas Pontes de
Caracterização de células viáveis e não cultiváveis em
Xanthomonas citri pv. *anacardii* / Lucas Pontes de Lucena. –
2019.
47 f. : il.

Orientador: Marco Aurélio Siqueira da Gama.
Coorientadora: Flávia Figueira Aburjaile.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife,
BR-PE, 2019.
Inclui referências.

1. Podridão negra 2. Caju – Doenças e pragas 3. Bactérias
fitopatogênicas 4. Fitopatologia 5. Células - Cultura e meios de cultura
I. Gama, Marco Aurélio Siqueira da, orient. II. Aburjaile, Flávia
Figueira, coorient. III. Título

CDD 632

CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS E NÃO CULTIVÁVEIS EM
Xanthomonas citri pv. *anacardii*

Lucas Pontes de Lucena

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 26/07/2019

ORIENTADOR:

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

EXAMINADORES:

Prof^ª. Dr^ª. Elineide Barbosa de Souza (UFRPE)

Dr. Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho (Fiocruz)

RECIFE-PE
JULHO – 2019

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pela oportunidade de realizar a graduação em agronomia, e ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, por todo conhecimento fitopatológico.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama e à minha coorientadora Profa. Dra. Flávia Figueira Aburjaile, pela orientação e conhecimento imprescindíveis ao meu desenvolvimento profissional e pessoal durante todo o mestrado. À Profa. Dra. Elineide Barbosa de Souza pelo apoio e conselhos dados na execução do trabalho, e à Profa. Dra. Ana Maria Benko-Iseppon, por todo o suporte e estrutura imprescindíveis à realização do projeto.

Aos integrantes do Laboratório de Fitobacteriologia, por cada momento compartilhado, de apoio e crescimento. Especialmente os colegas Géssyka Albuquerque, Greecy Albuquerque, Claudéana Souza, Emanuel Assunção, Beatriz Cruz e Leandro Velez, e professores Elineide Souza e Adriano Silva.

À minha namorada Géssyka Albuquerque, pelo amor e apoio em todos os momentos.

À minha família, especialmente meu pai Manoel Lucena (*in memoriam*) por me orientar, apoiar e acreditar em mim em todos os momentos, e a minha mãe Tereza Pontes, pelo carinho, força e ânimo, ao meu irmão Rodrigo Lima, pelos conselhos e conhecimento compartilhado. A todos os familiares que estiveram ao meu lado, me acompanhando e apoiando.

Aos professores dos cursos de graduação em agronomia e pós-graduação em fitopatologia, pelo conhecimento agrônomo e fitopatológico repassados.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	6
GENERAL ABSTRACT.....	7
CAPÍTULO I.....	8
INTRODUÇÃO GERAL	9
1. A cultura do cajueiro	9
2. Doenças do cajueiro.....	10
3. Mancha Angular e Mancha de <i>Xanthomonas</i>	10
4. Características do Gênero <i>Xanthomonas</i>	12
5. Células viáveis e não cultiváveis (VBNC)	14
Referências bibliográficas.....	17
CAPÍTULO II	22
Caracterização de células viáveis e não cultiváveis em <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>anacardii</i>	23
INTRODUÇÃO	24
RESULTADOS	26
DISCUSSÃO	27
PROCEDIMENTOS	29
AGRADECIMENTOS	33
REFERÊNCIAS	34
CAPÍTULO III	47
CONCLUSÕES GERAIS	48

RESUMO GERAL

O cajueiro é uma planta originária do Brasil, concentrada principalmente na região Nordeste, cuja produtividade é consideravelmente afetada pela incidência de doenças. Apesar da maioria das doenças serem de etiologia fúngica, tem-se observado a ocorrência de doenças bacterianas, como a mancha angular e a mancha de *Xanthomonas* causadas por *Xanthomonas citri* pv. *anacardii*, em cajueiros cultivados nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte. O principal sintoma da mancha angular são manchas necróticas escurecidas, restritas pelas nervuras do limbo foliar, enquanto no caso da mancha de *Xanthomonas*, os sintomas são necroses nos frutos e nas nervuras secundárias das folhas da planta. A introdução de material propagativo infectado é a principal forma de disseminação da doença entre lavouras. Os principais meios de sobrevivência relatados de *X. citri* são restos culturais de ciclos anteriores do hospedeiro, hospedeiros alternativos, sobrevivência epifítica, endofítica e por meio de células viáveis e não cultiváveis (*viable but nonculturable* - VBNC) do patógeno. Neste último caso, VBNC não são observadas em meio de cultura, porém viáveis, permitindo a sobrevivência bacteriana. Fatores ambientais adversos capazes de inibir o desenvolvimento da bactéria podem induzir o estado VBNC, que tendem a se manter em baixa atividade metabólica durante longos intervalos de tempo, porém podendo ser revertido quando em condições favoráveis para o crescimento da bactéria. Diante disso, este trabalho objetivou a caracterização de células em estado VBNC em dois isolados pigmentados (CCRMTAQ13 e CCRMTAQ18) e um isolado apigmentado (IBSBF2579) de *X. citri* pv. *anacardii*. Para esse fim, os genomas dos três isolados foram obtidos do banco de dados do NCBI, anotados e, em seguida, analisados visando a identificação de genes codificados em condição de VBNC. Para avaliar o estado de VBNC, foi obtida uma curva de crescimento bacteriano, determinando-se a fase exponencial (log) e de morte dos isolados. Essas fases foram avaliadas quantificando-se a concentração de células por meio de PCR quantitativa (qPCR) com *primers* construídos com base no gene *relA*, seguindo-se a avaliação da patogenicidade das células em estado VBNC por meio de inoculações artificiais em cajueiros. Foram identificados 13 genes relatados como expressos no estado de VBNC nos genomas dos três isolados, sendo o gene *relA* selecionado para as análises de qPCR. Curvas de crescimento bacteriano *in vitro* construídas em meio de cultura NYD permitiram a determinação da quantidade de células totais viáveis presentes nas fases exponencial e de morte para os isolados CCRMTAQ13 (24/96h), CCRMTAQ18 (48/72h) e IBSBF2579 (96/168h). A caracterização do estado VBNC em *X. citri* pv. *anacardii* ocorreu pela comparação entre a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e a quantidade de cópias do gene *relA*/mL na fase de morte da curva de crescimento. No método de diluição seriada, na fase de morte foram obtidos 0 UFC/mL em CCRMTAQ13, $0,2 \times 10^8$ UFC/mL em CCRMTAQ18 e $0,07 \times 10^8$ UFC/mL em IBSBF2579. Através da qPCR, foram quantificadas $2,68 \times 10^8$ cópias do gene *relA* /mL em CCRMTAQ13, $2,38 \times 10^8$ cópias do gene *relA* /mL em CCRMTAQ18, e $7,34 \times 10^8$ cópias do gene *relA* /mL em IBSBF2579. A comparação dos dados quantitativos demonstrou valores até 100 vezes maiores nos ensaios por qPCR para a fase de morte. Para a variável período de incubação não houve interação significativa entre os isolados e as fases de crescimento, havendo diferenças significativas apenas entre as fases de crescimento (exponencial e de VBNC), com a fase LOG levando em média 1,91 dias para causar os primeiros sintomas. Para severidade, avaliada aos vinte dias após a inoculação, foi observada interação entre os isolados e as fases de crescimento, sendo o isolado CCRMTAQ18 na fase LOG, o de menor média ($3,95 \text{ mm}^2$), e o isolado IBSBF2579, a maior média ($7,17 \text{ mm}^2$). A caracterização das VBNC possibilita uma nova perspectiva para a diagnose de fitobactérias, e nesse estudo foi realizado o primeiro relato da ocorrência de VBNC em *X. citri* pv. *anacardii*, uma importante bactéria fitopatogênica para região Nordeste do Brasil.

Palavras chave: *Anacardium occidentale*, *Xanthomonas citri* pv. *anacardii*, VBNC.

GENERAL ABSTRACT

The cashew tree is a plant originating from Brazil, concentrated mainly in the Northeast region, whose productivity is considerably affected by the incidence of diseases. Although most diseases are of fungal etiology, bacterial diseases such as angular leaf spot and *Xanthomonas* spot caused by *Xanthomonas citri* pv. *anacardii*, in cashew trees grown in the states of Ceará and Rio Grande do Norte. The main symptom of angular leaf spot is darkened necrotic spots, restricted by leaf limb veins, while in the case of *Xanthomonas* spot, the symptoms are necrosis in the fruits and the secondary veins of the leaves of the plant. The introduction of infected seedlings is the main form of dissemination among crops. *X. citri*'s main reported means of survival are crop residues from previous host cycles, alternative hosts, epiphytic, endophytic and viable but nonculturable cells (VBNC) survival of the pathogen. In the latter case, VBNC are not observed in culture medium, but viable, allowing bacterial survival. Adverse environmental factors capable of inhibiting bacterial development may induce VBNC status, which tends to remain in low metabolic activity for long periods of time but may be reversed when under favorable conditions for bacterial growth. Therefore, this work aimed the characterization of VBNC in two pigmented isolates (CCRMTAQ13 and CCRMTAQ18) and one nonpigmented isolate (IBSBF2579) of *X. citri* pv. *anacardii*. To this end, the genomes of the three strains were obtained from the NCBI database, annotated and then analyzed for the identification of genes encoded under VBNC condition. To assess the state of VBNC, a bacterial growth curve was obtained, determining the exponential (log) and death phase of the isolates. These phases were evaluated by quantifying cell concentration by quantitative PCR (qPCR) with primers constructed based on *relA* gene, followed by the evaluation of pathogenicity of cells in VBNC state by artificial inoculation in cashew trees. Thirteen genes reported as expressed in the VBNC state were identified in the genomes of the three isolates, and the *relA* gene was selected for qPCR analysis. *In vitro* bacterial growth curves constructed in NYD culture media allowed the determination of the amount of total viable cells present in the exponential and death phases for CCRMTAQ13 (24/96h), CCRMTAQ18 (48/72h) and IBSBF2579 (96/168h) isolates). The characterization of the VBNC state in *X. citri* pv. *anacardii* occurred by comparing the number of colony forming units (CFU / mL) and the number of copies of the *relA* gene/mL at the death phase of the growth curve. In the serial dilution method, at the death phase, 0 CFU/mL were obtained in CCRMTAQ13, 0.2×10^8 CFU/mL in CCRMTAQ18 and 0.07×10^8 CFU / mL in IBSBF2579. Through qPCR, 2.68×10^8 copies of the *relA* / mL gene in CCRMTAQ13, 2.38×10^8 copies of the *relA*/mL gene in CCRMTAQ18, and 7.34×10^8 copies of the *relA*/mL gene in IBSBF2579. Comparison of quantitative data showed up to 100-fold higher values in the qPCR assays for the death phase. For the incubation period there was no significant interaction between isolates and growth phases, with significant differences only between growth phases (exponential and VBNC), with the LOG phase taking an average of 1.91 days to cause the first ones. symptoms. For severity, evaluated at twenty days after inoculation, interaction between isolates and growth phases was observed, being the CCRMTAQ18 isolate in the LOG phase, the lowest average (3.95 mm^2), and the IBSBF2579 isolate, the highest average. (7.17 mm^2). The characterization of VBNC allows a new perspective for the diagnosis of phyto bacteria, and in this study the first report of the occurrence of VBNC in *X. citri* pv. *anacardii*, an important phytopathogenic bacterium for northeastern Brazil.

Key words: *Anacardium occidentale*, *Xanthomonas citri* pv. *anacardii*, VBNC.

CAPÍTULO I

Introdução Geral

CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS E NÃO CULTIVÁVEIS EM *Xanthomonas citri* pv. *anacardii*

INTRODUÇÃO GERAL

1. A cultura do cajueiro

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) pertencente à família Anacardiaceae (D'SOUZA *et al.*, 1996) é uma planta tropical com centro de origem no Brasil (NAIR, 2010), país que é o maior produtor mundial do pseudofruto (ou pedúnculo), obtendo 1.775.253 toneladas no ano de 2016 (FAO, 2019). Na região Nordeste do país, a planta é capaz de crescer em todos os tipos de solo e possui alta capacidade de produção de sementes viáveis que são disseminadas no meio ambiente, formando novas plantas (LORENZI, 2008; SERRANO; PESSOA, 2016). Essa região caracteriza-se como a principal produtora do Brasil, sendo responsável por mais de 99% do total produzido no país, sucedida pelas regiões Norte e Centro-Oeste. Destaque para o estado do Ceará, que se caracteriza como o maior produtor nacional de castanha de caju, com mais de 460.000 toneladas produzidas no ano de 2018. No ranking nacional de produção, o Ceará é seguido pelos estados do Rio Grande do Norte, Piauí, Paraíba e Pernambuco, respectivamente (IBGE, 2019).

Historicamente, a produção de caju no Brasil foi focada inicialmente apenas no extrativismo, em propriedades de pequeno porte. A partir da segunda metade da década de 1940, o cultivo tornou-se mais organizado, com a finalidade de atender a demanda de castanha de caju. Por conta disso, é notável a transição entre o extrativismo e o cultivo tecnificado, evidenciando a necessidade de avanços na tecnologia na cultura (VIDAL NETO *et al.*, 2018). Atualmente, a produção de cajueiros se concentra entre pequenas e médias propriedades (área inferior a 100 ha) pertencentes a produtores, comunidades, associações ou assentamentos (SERRANO, 2016). A cultura do cajueiro apresenta grande importância socioeconômica no Brasil devido a possibilidade de comercialização de diversos produtos provenientes da cultura (VIDAL, 2016).

Apesar de ser o país de maior produção do pseudofruto de cajueiro do planeta, o Brasil não figura no ranking dos maiores exportadores mundiais de castanha, que é o fruto e o principal produto da cultura (DENDENA; CORSI, 2014; SENA *et al.*, 2019). A amêndoa extraída da castanha é rica em proteínas, lipídeos, carboidratos, fósforo, ferro, zinco e magnésio, tornando-a atrativa para a alimentação, e possui um óleo que pode ser utilizado para substituir o azeite de oliva (GAZZOLA *et al.*, 2018).

Em 2016, os principais exportadores mundiais de castanhas foram Vietnã, Nigéria, Índia e Costa do Marfim, respectivamente (FAO, 2018). Por sua vez, os principais importadores mundiais da amêndoa da castanha de caju foram Estados Unidos e a União Europeia (GUANZIROLI, 2009). Além do fruto e do pseudofruto, o cajueiro pode ser aproveitado através da casca da árvore, utilizada como adstringente e tônico, bem como das flores da árvore, as quais são melíferas e a seiva pode servir como matéria prima para a produção de tinta (GAZZOLA *et al.*, 2018).

2. Doenças do cajueiro

Nos últimos anos, a cultura do cajueiro tem sofrido com o declínio produtivo significativo atribuído a epidemias de doenças (CARDOSO; VIANA; MARTINS, 2018). Embora todos os órgãos da planta possam apresentar sintomas característicos, as mais facilmente identificadas são as doenças foliares, pelos danos que acarretam à cultura e pela simplicidade na visualização (CARDOSO *et al.*, 2013).

De acordo com Menezes (2017), o cajueiro é infectado principalmente por doenças causadas por organismos fúngicos, dentre estes os principais são: *Collectotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz. e Sacc., causador da antracnose, *Pseudoidium anacardii* (F. Noack) U. Braun e R.T.A. Cook), agente causal do oídio (MARTINS *et al.*, 2018) e fungos da família Botryosphaeriaceae, causadores de diversas doenças no cajueiro e considerados como importante fator limitante no semiárido brasileiro (ALVES *et al.*, 2015).

A mancha angular e a mancha de *Xanthomonas*, causadas por *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* são as únicas doenças bacterianas do cajueiro relatadas até o momento. Contudo ambas têm sido cada vez mais observadas e estudadas nos últimos anos (GAMA *et al.*, 2011; GAMA *et al.*, 2018).

3. Mancha Angular e Mancha de *Xanthomonas*

O primeiro registro da mancha angular no mundo foi realizado em 1909, após a observação da ocorrência da doença em mangueiras na África do Sul. Na ocasião, foram obtidas colônias amarelas resultantes do isolamento, sendo a bactéria descrita como *Bacillus mangiferae* Doidge (DOIDGE, 1915). No ano de 1957, a bactéria foi novamente reclassificada como *Erwinia mangiferae* (Doidge) Bergey *et al.* (BREED *et al.*, 1957). Posteriormente, foi verificada a patogenicidade deste patógeno em plantas de cajueiro e foi proposta uma nova

reclassificação para uma nova espécie, *Pseudomonas mangiferae-indicae* Patel *et al.* (PATEL *et al.*, 1948). Estudos subsequentes realizados por Robbs, Ribeiro, Kimura (1974) propuseram a recolocação do patógeno para o táxon *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (Patel *et al.*) Robbs *et al.*, além de incluir nessa classificação tanto isolados pigmentados como isolados apigmentados.

A mancha angular foi detectada em diversos países, como Japão, Quênia e Austrália (GAGNEVIN; PRUVOST, 2001). Os sintomas da doença caracterizam-se como manchas foliares encharcadas, que posteriormente tornam-se necróticas, limitadas pelas nervuras foliares (Ah-You *et al.*, 2007). No Brasil, o primeiro relato da doença foi realizado por Robbs em 1955, na região Centro-Oeste do país, sendo o hospedeiro da doença não especificado. Contudo, foi a partir deste relato que o nome popular da doença, mancha angular, foi estabelecido no Brasil (ROBBS, 1955). No Nordeste do país, a doença foi relatada apenas no ano de 1978, em mangueiras no estado do Ceará (ROBBS; PONTE; SALES, 1978), sendo que após três anos, a ocorrência da doença foi descrita em plantas de cajueiro (ROBBS *et al.* 1981).

A primeira observação dos sintomas da mancha de *Xanthomonas* foi realizada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, que detectou a ocorrência da doença no município de Pio IX, no estado do Piauí em 2003 (VIANA, 2006). Na ocasião, os sintomas observados foram manchas angulares, encharcadas, e escurecidas nas folhas e nas nervuras secundárias das folhas (VIANA *et al.*, 2007).

A mancha angular e a mancha de *Xanthomonas* foram inicialmente atribuídas a *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (Patel *et al.*) Robbs *et al.* (ROBBS; RIBEIRO; KIMURA, 1974; VIANA *et al.*, 2005; SADDLER; BRADBURY, 2005), uma bactéria que apresentava isolados pigmentados e apigmentados, cuja classificação taxonômica passou por diversas modificações. Em síntese, estudos taxonômicos reclassificaram isolados apigmentados obtidos de diferentes anacardiáceas como *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* e criaram o patovar *anacardii* (AH-YOU *et al.*, 2007). Posteriormente, o grupo no qual esses patovares estavam inseridos foi reposicionado para a espécie *X. citri*, resultando nos epítetos *X. citri* pv. *anacardii* e *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* (AH-YOU *et al.* 2009; CONSTATIN *et al.*, 2016). Adicionalmente, os isolados pigmentados também foram reclassificados como *X. citri* pv. *anacardii* (GAMA *et al.*, 2018).

Não existem estudos epidemiológicos da mancha angular e/ou da mancha de *Xanthomonas* do cajueiro. Contudo, estudos realizados com o cancro bacteriano da mangueira causado por isolados pigmentados e apigmentados de *Xanthomonas* demonstraram que a bactéria é favorecida por umidade relativa do ar próxima a 80% (CONSTANTIN *et al.* 2016;

ZOMBRÉ *et al.*, 2015, 2016). A disseminação a longas distâncias ocorre pela utilização de material propagativo infectado, sendo que ventos e chuvas favorecem a disseminação a curtas distâncias. A sobrevivência do patógeno ocorre principalmente em tecidos infectados (GAGNEVIN; PRUVOST, 2001). O manejo dessas doenças pode ser realizado de forma integrada com o uso de material propagativo sadio, uso de quebra-ventos e irrigação por gotejamento para controle do microclima, podas de limpeza (eliminando ramos que apresentem sintomas de infecção) e pulverizações quinzenais de oxiclureto de cobre até que as castanhas percam a coloração verde (GAGNEVIN; PRUVOST, 2001; VIANA *et al.*, 2006b).

Atualmente existem mais de 200 genomas de espécies do gênero *Xanthomonas* sequenciados e depositados no GenBank do NCBI, os quais 4 pertencem a *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* (Tabela 1) (NCBI, 2019).

Tabela 1. Informações genômicas sobre isolados de *X. citri* pv. *anacardii* depositados no NCBI

Isolado	Depósito no NCBI	Status do genoma	Nº contigs	Tamanho (Mb)	GC %	Plasmídeos	RNAs	Genes	Subsistemas
CFBP 2913	GCA_0 026886 25.1	Incompleto	25	5.202 72	64. 6	0	55	4720	349
IBSBF2579	GCA_0 028372 55.1	Incompleto	197	5.350 84	64. 0	0	57	5041	356
CCRMTAQ13	GCA_0 028984 75.1	Incompleto	195	5.269 96	63. 9	0	54	4761	349
CCRMTAQ18	GCA_0 028984 15.1	Incompleto	195	5.183 68	64. 1	0	54	4753	349

4. Características do Gênero *Xanthomonas*

O gênero *Xanthomonas* Dowson é composto por bactérias Gram negativas, com formato de bastonete, tamanho entre 0,8 e 2,0 µm, monotríquias, aeróbicas obrigatórias, incapazes de reduzir nitrato, catalase positivo e urease negativo (SADDLER; BRADBURY, 2005). A espécie tipo do gênero é *X. campestris* pv. *campestris*, agente causal da podridão negra das

brássicas. A patogenicidade das bactérias do gênero *Xanthomonas* em vegetais está ligada ao conjunto de genes *hrp*, grupo comumente encontrado em outras bactérias fitopatogênicas (PANIJEL *et al.*, 2013; LEE; ZHAO, 2015; JOVANOVIĆ *et al.*, 2017), conforme demonstrado pela homologia entre esses genes em *X. campestris* pv. *campestris* e *Ralstonia solanacearum*, agente causal da murcha das solanáceas (SADDLER; BRADBURY, 2005).

Uma característica marcante do gênero *Xanthomonas* é a produção de um pigmento amarelo denominado xantomonadina, embora algumas espécies, como por exemplo *X. citri* pv. *viticola* e alguns isolados de *X. citri* pv. *anacardii*, não produzam esse pigmento (GAMA *et al.* 2011; GAMA *et al.*, 2018). Em meios ricos em glicose essas bactérias tendem a produzir exopolissacarídeos comumente conhecidos como goma xantana, a qual é utilizada na produção de alimentos e na formulação de diversos produtos químicos (KADO, 2011). Este biopolímero tem a função aumentar a viscosidade de fluidos e é capaz de se manter estável em condições adversas (GARCÍA-OCHOA, 2000).

Dentro do gênero encontram-se mais de 100 bactérias de importância fitopatológica, tais como *X. campestris*, *X. axonopodis*, *X. citri* e seus patovares, que apresentam diversas características que as distinguem (KADO, 2011). Os integrantes do gênero são capazes de causar doenças em mais de 120 espécies de monocotiledôneas e mais de 250 espécies de dicotiledôneas. Apesar disso, doenças causadas por *Xanthomonas* em gimnospermas ainda não foram relatadas até o momento (SADDLER; BRADBURY, 2005). Apesar de se caracterizar como um gênero extenso de bactérias patogênicas a diversas espécies vegetais, a gama de hospedeiros dos patovares tem um alto nível de especificidade, geralmente restrito a determinadas famílias botânicas (JACQUES *et al.*, 2016). Nesse contexto, os prejuízos causados no cenário agrícola mundial fazem do gênero *Xanthomonas* extremamente relevante, compondo cerca de um terço do grupo das dez principais bacterioses de plantas estudadas em todo o planeta (MANSFIELD *et al.*, 2012).

As bactérias do gênero *Xanthomonas* utilizam diversos mecanismos de virulência e patogenicidade para infecção e multiplicação celular bem-sucedida nos tecidos dos hospedeiros. Entre os fatores de patogenicidade destacam-se as adesinas, que são complexos proteicos responsáveis pela aderência bacteriana em superfícies compostas por moléculas alvo, como tecidos vegetais específicos ou exsudados provenientes de ferimentos (KLEMM; SCHEMBRI, 2000). Os sistemas de secreção também são importantes fatores de patogenicidade para grande parte das espécies desse gênero. Até o momento, seis sistemas de secreção foram relatados em espécies de *Xanthomonas*, cada um deles apresentando diferentes funções na virulência e patogenicidade dessas bactérias (KADO, 2010). Polissacarídeos

extracelulares (EPS) também se caracterizam como um fator de virulência, geralmente interferindo significativamente na severidade das doenças (CHAN; GOODWIN, 1999; BÜTTNER; BONAS, 2009).

A sobrevivência das espécies e patovares de *Xanthomonas* pode ocorrer na rizosfera e na filosfera de hospedeiros alternativos (SILVA *et al.*, 2017), de forma epifítica e endofítica nos tecidos foliares (PRUVOST *et al.*, 2009), cancrios, brotos dormentes e cicatrizes foliares (LAMICHHANE, 2014). Alguns genes do grupo *hrp*, além de associados à patogenicidade, são também relatados como relacionados à sobrevivência dos integrantes de espécies pertencentes ao gênero (BÜTTNER; BONAS, 2010).

A disseminação das espécies e patovares de *Xanthomonas* pode ocorrer através de respingos de chuva, frutos e material de propagação infectados (sintomáticos ou assintomáticos), solo infectado, maquinário de tratos culturais e, possivelmente, por insetos (TOSTES *et al.*, 2014; KASTELEIN *et al.*, 2018). A penetração pode ocorrer através de aberturas naturais, geralmente hidatódios, e é favorecida por práticas culturais, como ferimentos provocados por podas, aerossóis resultantes de irrigação, ou por injúrias causadas por insetos (RYAN *et al.*, 2011; MENDONÇA; ZAMBOLIM; BADEL, 2017).

As técnicas de manejo para as bactérias do gênero *Xanthomonas* são diversificadas, contudo, essencialmente são indicadas práticas de controle cultural de forma integrada, como adubação balanceada, controle de insetos vetores, implementação de genótipos diversificados, a utilização de material propagativo sadio é uma outra importante medida de controle desses patógenos (LAMICHHANE, 2014). O controle químico se dá através da aplicação de fungicidas cúpricos de forma preventiva (MENDONÇA; ZAMBOLIM; BADEL, 2017). Em alguns casos, o controle biológico também é recomendado, entre os procariotos, as bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Streptomyces* são considerados eficientes na inibição de algumas doenças causadas por *Xanthomonas* (THAPA; BABADOOST, 2016).

5. Células viáveis e não cultiváveis (VBNC)

Células viáveis e não cultiváveis (viable but nonculturable - VBNC) é o termo dado a células bacterianas incapazes de crescer em meio de cultura, mas que permanecem vivas e capazes de retornar às atividades metabólicas em condições favoráveis (OLIVER, 2010). Ao se deparar com fatores limitantes à sobrevivência, a maioria das bactérias morre, contudo, algumas células remanescentes no estado de VBNC tendem a demonstrar baixa atividade metabólica, e

tornam-se plenamente cultiváveis após reversão deste mecanismo (OLIVER, 2005; TREVORS, 2011).

As bactérias capazes de entrar em estado VBNC geralmente são induzidas por condições de estresse, como aqueles provocados pela radiação UV (ZHANG *et al.*, 2015), déficit nutricional (ABURJAILE *et al.*, 2016), temperaturas extremas (LOWDER *et al.*, 2000), pH desfavorável (CUNNINGHAM O'BYRNE, OLIVER, 2009; JIANG *et al.*, 2016), agentes químicos antibacterianos, especialmente aqueles derivados de cobre (JIANG *et al.*, 2016) e estresse oxidativo (NOWAKOWSKA, OLIVER, 2013). Ao se deparar com condições que possibilitem a reversão do estado de VBNC, como ambiente rico nos nutrientes necessários à sobrevivência da bactéria, mecanismos metabólicos são ativados, resultando na chamada ressuscitação do procarionto (SU *et al.*, 2018). Para esse efeito, um dos principais fatores é o contato com o organismo hospedeiro, sendo a ocorrência da ressuscitação relatada em longos períodos após a indução do mecanismo nas bactérias, tanto em patógenos de animais, como observado na recuperação de células de *Salmonella enterica* 17 anos após a indução do estado VBNC por meio de carência nutricional (AMEL; AMINA, 2008). Em fitopatógenos também foi observada a reversão do estado VBNC em *R. solanacearum* quatro anos após a indução ao estado VBNC mediante déficit nutricional (ALVAREZ, LOPEZ, BIOSCA, 2008).

Atualmente o mecanismo de VBNC é relatado em diversas bactérias, com uma parcela significativa composta por micro-organismos patogênicos a mamíferos, como *Escherichia coli* (CHEN *et al.*, 2018), *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa* (LI *et al.*, 2014), *Salmonella* spp. (ZHAO *et al.*, 2017), e organismos fitopatogênicos, como *Rhizobium radiobacter* (ALEXANDER; PHAM; STECK, 1999), *Erwinia amylovora* (LEE; ZHAO, 2015; SANTANDER; FIGÀS-SEGURA; BIOSCA, 2018), *P. syringae* (POSTNIKOVA *et al.*, 2015), *R. solanacearum* (KONG *et al.*, 2014), *Acidovorax citrulli* (KAN *et al.*, 2019) e *X. citri* (DEL CAMPO *et al.*, 2009; PALMIERI *et al.*, 2010). No gênero *Xanthomonas*, o estudo do mecanismo é relatado desde 1999 em *X. campestris* pv. *campestris* (GHEZZI; STECK, 1999). No entanto, a maioria dos trabalhos foram realizados com *X. citri* subsp. *citri*, avaliando-se indução ao estado VBNC por meio da utilização de compostos cúpricos (DEL CAMPO *et al.*, 2009; PALMIERI *et al.*, 2010; GOLMOHAMMADI *et al.*, 2013).

No presente momento, o entendimento da ocorrência das VBNC vem sendo esclarecido com o auxílio de estudos moleculares, utilizando-se de ferramentas, como qPCR para a quantificação de genes ligados ao estado de viabilidade (KONG *et al.*, 2014). Por meios desses estudos têm sido possível encontrar genes ligados à VBNC atuando em diversos mecanismos do metabolismo bacteriano, como *fliG*, responsável pela motilidade (ASAKURA *et al.*, 2007),

genes responsáveis pela biossíntese de metabólitos (SU *et al.*, 2016), *dps*, que atua na proteção contra estresse oxidativo (UM *et al.*, 2013), *tnaA*, envolvido na formação de biofilme (MENG *et al.*, 2015), *relA*, relacionado à resistência a estresse ambiental (ASAKURA *et al.*, 2007) e genes de geração de energia e composição da parede celular (POSTNIKOVA *et al.*, 2015).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar a ocorrência de VBNC em isolados pigmentados e apigmentados de *X. citri* pv. *anacardii*, dessa forma estabelecendo novas perspectivas na diagnose da bactéria em cultivos de cajueiro. Assim, neste trabalho visamos (i) determinar a ocorrência de VBNC nos isolados CCRMTAQ13, CCRMTAQ18 e IBSBF2579 de *X. citri* pv. *anacardii*; (ii) caracterizar *in silico* os genes ligados à ocorrência de VBNC nos genomas desses isolados; (iii) determinar as fases de crescimento desses isolados *in vitro*; (iv) detectar e quantificar VBNC em *X. citri* pv. *anacardii* por meio do gene *relA* através da qPCR em cada um dos isolados; (v) avaliar a capacidade *X. citri* pv. *anacardii* (quando as células estiverem em estado VBNC), causar doença em mudas de cajueiro.

Referências bibliográficas

- ABURJAILE, F. F.; MADEC, M. N.; PARAYRE, S.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; LE LOIR, Y.; FALENTIN, H. The Long-term survival of *Propionibacterium freudenreichii* in a context of nutrient shortage. **Journal of Applied Microbiology**, London, v. 120, n. 2, p. 432-440, 2016.
- AH-YOU, N.; GAGNEVIN, L.; GRIMONT, P. A. D.; BRISSE S.; NESME, X.; CHIROLEU, F.; BUI THINGOC, L.; JOUEN, E.; LEFEUVRE, P.; VERNIERE, C.; PRUVOST, O. Polyphasic characterization of xanthomonads pathogenic to members of the Anacardiaceae and their relatedness to species of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, n. 2, p. 306-318, 2009.
- AH-YOU, N.; GAGNEVIN, L.; CHIROLEU, F.; JOUEN, E.; RODRIGUES NETO, J.; PRUVOST, O. Pathological variations within *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* support its separation into three distinct pathovars that can be distinguished by amplified fragment length polymorphism. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, n. 12, 2007.
- ALEXANDER, E.; PHAM, D.; STECK, T. R. The viable-but-nonculturable condition is induced by copper in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 8, p. 3754-3756, 1999.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ALVAREZ, B.; LOPEZ, M. M.; BIOSCA, E. G. Survival Strategies and Pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* Phylotype II Subjected to Prolonged Starvation in Environmental Water Microcosms. **Microbiology**, Reading, v. 154, n. 11, p. 3590-3598, 2008.
- ALVES, E. S.; CARDOSO, J. E.; LIMA, J. S.; SILVA, L. G. **Efeito das condições edafoclimáticas na ocorrência da resinose do cajueiro**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2015. 28 p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 100).
- 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**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 869-879, 2007.
- BAIROCH, A.; APWEILER, R.; WU, A. H.; BARKER, W. C.; BOECKMANN, B.; FERRO, S.; GASTEIGER, E.; HUANG, H.; LOPEZ, R.; MAGRANE, M.; MARTIN, M. J.; NATALE, D. A.; O'DONOVAN, C.; REDASCHI, N.; YEH, L. L. The universal protein resource (UniProt). **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, p. D154-D159, 2005.
- BÜTTNER, D.; BONAS, U. Regulation and Secretion of *Xanthomonas* Virulence Factors. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 107-133, 2010.
- CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P.; CYSNE, A. Q.; FARIAS, F. C.; SOUSA, R. N. M. **Clone Embrapa 51: uma Alternativa para Resistência à Resinose-do-Cajueiro**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 3 p. (Comunicado técnico, 130).
- CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P.; FREIRE, F. C. O.; CYSNE, A. Q.; FARIAS, F. C.; CAVALCANTI, J. J. V. **Manejo da resinose do cajueiro**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2009. 3 p. (Comunicado técnico, 154).
- CARDOSO, J. E.; VIANA, F.M.P.; FREIRE, F. C. O.; MARTINS, M.V.V. Doenças do cajueiro. In: Araújo, J. P. P. (Org.). **Agronegócio caju: práticas e inovações**. 1ed. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2013, v. 1, p. 217-238.
- CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P.; MARTINS, M. V. V. **Doenças causadas por fungos da família Botryosphaeriaceae em cajueiro**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2018. 17 p. (Circular Técnica, 47).

- CARVER, T.; HARRIS, S. R.; BERRIMAN, M.; PARKHILL, J.; McQUILLAN, J. A. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 464-469, 2012.
- CHAN, J. W. Y. F.; GOODWIN, P. H. Differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* from *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* by PFGE and RFLP. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, n. 9, p. 867-878, 1999.
- CONSTANTIN, E. C.; CLEENWERCK, I.; MAES, M.; BAEYEN, S.; VAN MALDERGHEM, C.; DE VOS, P.; COTTYN, B. Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. **Plant pathology**, Oxford, v. 65, n. 5, p. 792-806, 2016.
- D'SOUZA, L.; D'SILVA, L.; MALLYA, S.; AUGUSTINE, A. C.; RAJENDRA, K.; KULKARNI, K. R.; CARDOZA, V. *Anacardium occidentale* L. (Cashewnut). In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Trees IV**. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Berlin: Springer, 1996. v 35, p. 31-49.
- SENA, E. O. A. L.; SILVA, P. S. O.; ARAUJO, H. G. S.; BATISTA, M. C. A.; MATOS, P. N.; SARGENT, S. A.; OLIVEIRA JUNIOR, L. F. G.; CARNELOSSI, M. A. G. Postharvest quality of cashew apple after hydrocooling and cold room. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 155, p. 65-71, 2019.
- DEL CAMPO, R. RUSSI, P.; MARA, H.; PEYROU, M.; PONCE DE LEON, I.; GAGGERO, C. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* enters the VBNC state after copper treatment and retains its virulence. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 298, n. 2, p. 143-148, 2009.
- DENDENA, B.; CORSI, S. Cashew, from seed to market: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 34, n. 4, p. 753-772, 2014.
- DOIDGE, E. A bacterial disease of the mango *Bacillus mangiferae* n. sp. **Annals of Applied Biology**, London, v. 2, n. 1, p. 1-45, 1915.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Production of cashewapple: top 10 producers. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 01 maio 2018.
- GAGNEVIN, L.; PRUVOST, O. Epidemiology and control of mango bacterial black spot. **Plant Disease**, Saint. Paul v. 85, n. 9, p. 928-935, 2001.
- GAMA, M. A. S.; MARIANO, R. L. R.; SILVA JÚNIOR, W. J.; FARIAS, A. R. G.; BARBOSA, M. A. G.; FERREIRA, M. A. S. V.; COSTA JÚNIOR, C. R. L.; SANTOS, L. A.; SOUZA, E. B. 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. **Phytopatology**, Saint Paul, p.1143-1153, 2018.
- GAMA, M. A. S.; MARIANO, R. L. R.; VIANA, F. M. P.; FERREIRA, M. A. S. V.; SOUZA, E. B. Polyphasic characterization of pigmented strains of *Xanthomonas* pathogenic to cashew trees. **Plant disease**, Saint. Paul, v. 95, n. 7, p. 793-802, 2011.
- GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 18, n. 7, p. 549-579, 2000.
- GAZZOLA, J.; GAZZOLA, R.; SOUZA, G. S. ; COELHO, C. H. M.; WANDER, A. E.; CABRAL, J. E. O. Castanha de caju e sua amêndoa: composição e importância dos ácidos graxos - produção e comércio mundiais. In: SOARES, N. S.; MERELLES, A. E. de F. (Org.). **Comércio internacional de produtos agrícolas da região Nordeste do Brasil**. Fortaleza: Edições BNB, 2018. Cap. 2, p. 69-97.
- 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**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 203-208, 1999.
- GUANZIROLI, C. E.; SOUZA FILHO, H. M.; VALENTE JUNIOR, A. S. **Cadeia produtiva da castanha de caju**: Estudo das Relações de Mercado. Fortaleza: Banco do Nordeste, 2009. 152p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **SIDRA 2019**: sistema IBGE de recuperação automática. Rio de Janeiro: Instituto brasileiro de geografia e estatística, 2019. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>>. Acesso em: 26 jun. 2019.

JACQUES, M.; ARLAT, M.; BOULANGER, A.; BOUREAU, T.; CARRÈRE, S.; CESBRON, S.; CHEN, N. W. G.; COCIANCICH, S.; DARRASSE, A.; DENANCÉ, N.; SAUX, M. F. GAGNEVIN, L.; KOEBNIK, R.; LAUBER, E.; NOËL, L. D.; PIERETTI, I.; PORTIER, P.; PRUVOST, O.; RIEUX, A.; ROBÈNE, I.; ROYER, M.; SZUREK, B. VERDIER, V.; VERNIÈRE, C. Using ecology, physiology, and genomics to understand host specificity in *Xanthomonas*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 54, p. 1-25, 2016.

JOVANOVIC, M.; WAITE, C.; JAMES, E.; SYN, N.; SIMPSON, T.; KOTTA-LOIZOU, I.; BUCK, M. Functional characterization of key residues in regulatory proteins HrpG and HrpV of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 30, n. 8, p. 656-665, 2017.

KADO, C. I. Classification of plant-pathogenic bacteria. In: _____. **Plant bacteriology**, Saint Paul: The American Phytopathological Society, 2010, p. 21-62.

KASTELEIN, P.; EVENHUIS, A.; VAN DER ZOUWEN, P. S.; KRIJGER, M. VAN DER WOLF, J. M. Spread of *Xanthomonas fragariae* in strawberry fields by machinery. **EPPO Bulletin**, Paris, v. 48, n. 3, p. 569-577, 2018.

KLEMM, P.; SCHEMBRI, M. A. Bacterial adhesins: function and structure. **International journal of medical microbiology**, Amsterdam, 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. Induction of the viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* by low temperature in the soil microcosm and its resuscitation by catalase. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 10, p. 1-11, 2014.

LAMICHHANE, J. R. *Xanthomonas arboricola* diseases of stone fruit, almond, and walnut trees: progress toward understanding and management. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 98, n. 12, p. 1600-1610, 2014.

LEE, J. H.; ZHAO, Y. Integration host factor is required for RpoN-Dependent hrpL gene expression and controls motility by positively regulating rsmB sRNA in *Erwinia amylovora*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 106, n. 1, p. 29-36, 2015.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 5.ed. Nova Odessa: Instituto plantarum, 2008. v. 1, 384 p.

MANSFIELD, J.; GENIN, S.; MAGORI, S.; CITOVSKY, V.; SRIARIYANUM, M.; RONALD, P.; DOW, M.; VERDIER, V.; BEER, S. V.; MACHADO, M. A.; TOTH, J.; SALMOND, G.; FOSTER, G. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 13, n. 6, p. 614-629, 2012.

MARTIN, P. J.; TOPPER, C. P.; BASHIRU, R. A.; BOMA, F.; WAAL, D.; HARRIES, H. C.; KASUGA, L. J.; KATANILA, N.; KIKOKA, L. P.; LAMBOLL, R.; MADDISON, A. C.; MAJULE, A. E.; MASAWA, P. A.; MILLANZI, K. J.; NATHANIELS, N. Q.; SHOMARI, S. H.; SIJAONA, M. E.; STATHERS, T. Cashew nut production in Tanzania: Constraints and progress through integrated crop management. **Crop Protection**, Guildford, v. 16, n. 1, p. 5-14, 1997.

MARTINS, M. V. V.; LIMA, J. S.; CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P.; OOTANI, M. A. Progresso do oídio em função da fenologia do cajueiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 44, n. 2, p. 178-184, 2018.

MENDONÇA, L. B. P.; ZAMBOLIM, L.; BADEL, J. L. Bacterial citrus diseases: major threats and recent progress. **Journal of Bacteriology & Mycology**, Edmond, v. 5, n. 4, p. 340-350, 2017.

MENEZES, M. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. v. 2, p. 215-218.

MENG, L.; ALTER, T.; AHO, T.; HUEHN, S. Gene expression profiles of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but non-culturable state. **FEMS microbiology ecology**, Oxford, v. 91, n. 5, p. 1-12, 2015.

- NAIR, K. P. **The agronomy and economy of important tree crops of the developing world**. Elsevier, 2010, 368p.
- OLIVER, J. D. The viable but nonculturable state in bacteria. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 43, n. 1, p. 93-100, 2005.
- PALMIERI, A. C. B. AMARAL, A. M.; HOMEM, R. A.; MACHADO, M. A. Differential expression of pathogenicity- and virulence-related genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* under copper stress. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 348–353, 2010.
- PANIJEL, M.; CHALUPOWICZ, L.; SESSA, G.; MANULIS-SASSON, S.; BARASH, I. Global regulatory networks control the Hrp regulon of the gall-forming bacterium *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophylae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 26, n. 9, p. 1031–1043, 2013.
- PAPA, M. F. S.; MATOS, E. C.; ALMEIDA, I. M. C.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; BOLIANI, A. C. Ocorrência da mancha-angular (*Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*) em cajueiro no estado do Mato Grosso do Sul. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27, p. 119, 2001.
- POSTNIKOVA, O.; SHAO, J. Y.; 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**, Lausanne, v. 6, n. 1419, p. 1-14, 2015.
- PRUVOST, O.; SVELON, C.; BOYER, C.; CHIROLEU, F.; GAGNEVIN, L.; JACQUES, M. A. Populations of *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* from asymptomatic mango leaves are primarily endophytic. **Microbial Ecology**, New York, v. 58, n. 1, p. 170-178, 2009.
- ROBBS, C. F. Algumas bactérias fitopatogênicas do Distrito Federal. **Agronomia**, v. 14, n. 2, p. 147-164, 1955.
- ROBBS, C. F.; NETO, J. R.; RIBEIRO, R. L. D.; KIMURA, O. Annotated list of bacterial plant pathogens in Brazil. In: International plant pathogenic bacteria, 5., 1981, Cali. Proc. 5th. Int. Conf. Plant. Path. Bacteriol. Cali: CIAT, 1981. p. 601-612.
- ROBBS, C. F.; PONTE, J. J.; SALES, M. G. Nota sobre *Xanthomonas mangiferaeindicae* no Nordeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 3, p. 215-217, 1978.
- RYAN, R. P.; VORHÖLTER, F. J.; POTNIS, N.; JONES, J. B.; VAN SLUYS, M. A.; BOGDANOVA, A. J.; DOW, J. M. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 9, n. 5, p. 344-355, 2011.
- SADDLER, G. S.; BRADBURY, J. F. Xanthomonadales ord. nov. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. R. (Eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria**. Boston: Springer, 2005. v. 2, p. 63-122.
- SANTANDER, R. D.; FIGÀS-SEGURA, À.; BIOSCA, E. G. *Erwinia amylovora* catalases katA and katG are virulence factors and delay the starvation-induced viable but non-culturable (VBNC) response. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 19, n. 4, p. 922-934, 2018.
- SERRANO, L. A. L.; PESSOA, P. F. A. P. Aspectos Econômicos da Cultura do Cajueiro In: SERRANO, L. A. L. (Ed.). **Sistema de produção do caju**. 2. ed. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2016. 193 p.
- SILVA, J. C.; SILVA JÚNIOR, T. A. F.; SOMAN, J. M.; TOMASINI, T. D.; SARTORI, M. M. P.; MARINGONI, A. C. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the phyllosphere and rhizosphere of weeds. **Plant pathology**, Oxford, v. 66, n. 9, p. 1517-1526, 2017.
- 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**, San Francisco, v. 11, n. 1, p. 1-19, 2016.
- SUNDIN, G. W.; CASTIBLANCO, L. F.; YUAN, X.; ZENG, Q.; YANG, C. Bacterial disease management: challenges, experience, innovation and future prospects. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 17, n. 9, p. 1506–1518, 2016.

- THAPA, S.; BABADOOST, M. Effectiveness of chemical compounds and biocontrol agents for management of bacterial spot of pumpkin caused by *Xanthomonas cucurbitae*. **Plant Health Progress**, Saint Paul, v. 17, n. 2, p. 106-113, 2016.
- TOSTES, G. de O.; ARAUJO, J. S. P.; FARIAS, A. R. G.; FRADE, D. A. R.; OLIVARES, F. L. Detection and Cellular Localization of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* in Seeds of Commercial “Red Globe” Grapes. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 39, n. 2, p. 134-140, 2014.
- TREVORS, J. T. Viable but non-culturable (VBNC) bacteria: gene expression in planktonic and biofilm cells. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 86, n. 2, p. 266-273, 2011.
- VIANA, F. M. P.; FERREIRA, M. A. S. V.; MARIANO, R. de L. R.; SARAIVA, H. A. O.; CARDOSO, J. E.; TRINDADE, L. C. **Mancha-de-xanthomonas**: nova doença do cajueiro. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006a. 20 p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 24).
- VIANA, F. M. P.; SARAIVA, H. A. O.; FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E. **Mancha-de-xanthomonas-do-cajueiro**: sintomas e controle. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006b. 3 p. (Comunicado Técnico, 114).
- VIDAL NETO, F. C.; ROSSETTI, A. G.; BARROS, L. M.; CAVALCANTI, J. J. V.; MELO, D. S. **Desempenho agrônômico de clones de cajueiro no litoral do Ceará**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2018. 23 p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 163).
- VIDAL, M. F. **Situação da cajulicultura nordestina após a seca**. Fortaleza: Escritório técnico de estudos econômicos do Nordeste - ETENE, 2016. 25 p.
- ZOMBRÉ, C.; SANKARA, P.; OUÉDRAOGO, S. L.; WONNI, I.; PRUVOST, O.; BOYER, C.; VERNIÈRE, C.; ADANDONON, A.; VAYSSIÈRES, J. F.; AHOHUENDO, B. C. First report of *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* causing mango bacterial canker on *Mangifera indica* L. in Benin. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 99, n. 12, p. 1854–1854, 2015.
- ZOMBRÉ, C.; WONNI, I.; OUÉDRAOGO, S. L.; KPENOUA, K. E.; ASSIGNON, K.; SANKARA, P.; VERNIÈRE, C.; BOYER, C.; BOYER, K.; JAVEGNY, S.; PRUVOST, O. First report of *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* causing mango bacterial canker on *Mangifera indica* in Togo. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 101, n. 3, p. 503–503, 2016.

CAPÍTULO II

Caracterização de células viáveis e não cultiváveis em *Xanthomonas citri* pv. *anacardii*

Molecular Plant Pathology

1 **Caracterização de células viáveis e não cultiváveis em *Xanthomonas citri* pv.**
2 ***anacardii***

3
4 Lucas Pontes de Lucena¹; Ana Maria Benko-Iseppon²; Rodrigo Dias de Oliveira
5 Carvalho³; Flávia Figueira Aburjaile² e Marco Aurélio Siqueira da Gama¹

6
7 ¹ Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco 50670-901,
8 Recife, Pernambuco, Brasil

9 ² Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco 50740-600, Recife,
10 Pernambuco, Brasil

11 ³ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

12
13 **RESUMO**

14 A mancha angular e a mancha de *Xanthomonas* são as únicas doenças bacterianas
15 relatadas na cultura do cajueiro, sendo ambas causadas por *Xanthomonas citri* pv.
16 *anacardii*. Por se tratar de uma doença disseminada principalmente por material
17 propagativo, é necessário o conhecimento dos mecanismos de sobrevivência do agente
18 causal. Dessa forma, o presente estudo caracterizou a ocorrência de células viáveis e não
19 cultiváveis (viable but nonculturable - VBNC) de isolados pigmentados (CCRMTAQ13
20 e CCRMTAQ18) e apigmentado (IBSBF2579) de *X. citri* pv. *anacardii*, integrando
21 estudos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. Nas análises *in silico* foram identificados 13 genes
22 expressos durante a fase de VBNC nos genomas dos três isolados. Para a caracterização
23 de VBNC *in vitro*, foram comparadas as concentrações bacterianas (UFC/mL)
24 determinadas por meio de curvas de crescimento, com a quantidade de cópias do gene
25 *relA*/mL por meio de qPCR. Os dados obtidos por qPCR demonstraram número de
26 células/mL que superam todas as leituras de diluição seriada na mesma fase dos isolados.
27 Adicionalmente, os isolados foram inoculados nas fases exponencial e de VBNC, em
28 mudas de cajueiro e posteriormente avaliados quanto aos períodos de incubação (PI) e
29 severidade (SEV) aos 20 dias após a inoculação. Não houve interação significativa entre
30 os fatores para o PI. Porém, foi observada diferença no PI entre fases exponencial (2,41
31 dias) e de VBNC (4,58 dias). Em SEV, a interação significativa foi verificada entre os
32 fatores estudados, onde o isolado CCRMTAQ13 na fase de VBNC demonstrou a SEV
33 mais baixa (3,95 mm²). Para o nosso conhecimento, esse é o primeiro relato da ocorrência
34 do mecanismo de VBNC em isolados de *X. citri* pv. *anacardii*. Esses resultados

35 comprovaram que *X. citri* pv. *anacardii* é capaz de entrar no estado de VBNC, mas capaz
36 de reverter esse estado através do contato com o apoplasto do seu hospedeiro, definindo
37 um novo patamar na diagnose de fitobacterioses em material vegetal proveniente de
38 cajueiro, demonstrando a necessidade do uso de práticas integradas de detecção.

39

40 Palavras Chave: VBNC, *Xanthomonas citri*, qPCR.

41

42 INTRODUÇÃO

43

44 *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* é uma bactéria Gram negativa, aeróbica
45 obrigatória, monotríquia, sensível à maioria dos agentes antibacterianos comerciais, como
46 cúpricos e tetraciclina, que apresenta isolados pigmentados e apigmentados (Gama *et*
47 *al.*, 2011; Saddler e Bradbury, 2005). Essa bactéria é responsável por causar a mancha
48 angular e a mancha de *Xanthomonas* do cajueiro, cujos sintomas se caracterizam como
49 manchas necróticas de coloração pardo-escura restritas pelas nervuras folhas (Papa *et al.*,
50 2001; Gama *et al.*, 2015) e pelo escurecimento das nervuras foliares, manchas angulares
51 nas folhas, e lesões necróticas nos frutos (Gama *et al.*, 2015), respectivamente.

52 Até o momento, existem mais de 200 genomas de espécies do gênero
53 *Xanthomonas* sequenciados e depositados no GenBank/NCBI, dos quais 4 pertencem a
54 *X. citri* pv. *anacardii* (NCBI, 2019). No entanto, ainda não se conhece a existência de
55 células viáveis e não cultiváveis (VBNC) nessa bactéria. O termo VBNC tem sido
56 utilizado para células bacterianas incapazes de crescer em meio de cultura, mas que
57 permanecem vivas e capazes de retornar às plenas atividades metabólicas em condições
58 favoráveis (Oliver, 2010), como ambientes contendo nutrientes necessários à
59 sobrevivência da bactéria (Su *et al.*, 2018) e durante o contato com o hospedeiro (Amel e
60 Amina, 2008).

61 As VBNC têm sido estudadas com o auxílio de estudos moleculares, utilizando
62 qPCR para a quantificação de genes ligados ao estado de viabilidade, quando as células
63 bacterianas não podem mais ser cultivadas. Nesse caso, têm sido utilizados genes ligados
64 às VBNC atuando em diversos mecanismos do metabolismo bacteriano, como *fliG*,
65 responsável pela motilidade (Asakura *et al.*, 2007), genes responsáveis pela biossíntese
66 de metabólitos (SU *et al.*, 2016), *dps*, que atua na proteção contra estresse oxidativo (Um
67 *et al.*, 2013), *tnaA*, envolvido na formação de biofilme (Meng *et al.*, 2015), *relA*,

68 responsável pela adaptação a estresses ambientais, e genes de geração de energia e
69 composição da parede celular (Postnikova *et al.*, 2015).

70 As VBNC são relatadas em diversas bactérias, das quais uma parcela é composta
71 por organismos patogênicos a animais, como *Escherichia coli* (Chen *et al.*, 2018),
72 *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa* (LI *et al.*, 2014), *Salmonella* spp.
73 (Zhao *et al.*, 2017), e importantes organismos fitopatogênicos, como *Rhizobium*
74 *radiobacter* (Alexander; Pham; Steck, 1999), *Erwinia amylovora* (Lee e Zhao, 2015;
75 Santander; Figàs-Segura; Biosca, 2018), *Pseudomonas syringae* (Postnikova *et al.*, 2015),
76 *Acidovorax citrulli* (Kan *et al.*, 2019), *Ralstonia solanacearum* (Kong *et al.*, 2014) e *X.*
77 *citri* (Campo *et al.*, 2009; Palmieri *et al.*, 2010). No gênero *Xanthomonas*, a ocorrência
78 de VBNC tem sido relatada em *X. campestris* pv. *campestris* (Ghezzi e Steck, 1999) e *X.*
79 *citri* subsp. *citri* (Del Campo *et al.*, 2009; Golmohammadi *et al.*, 2013). Nessas bactérias,
80 o estado de VBNC foi induzido através do contato da suspensão bacteriana com sulfato
81 de cobre (CuSO₄), sendo revertido após o contato com o hospedeiro. Nesses estudos
82 foram aplicados diversos métodos de detecção de VBNC, sendo a quantidade de células
83 totais medida pela densidade ótica, e a viabilidade obtida por qPCR ou por kits comerciais
84 de avaliação microscópica de viabilidade (Del Campo *et al.*, 2009; Golmohammadi *et al.*,
85 2013).

86 Tendo em vista a ocorrência da recuperação de células a partir do estado de
87 VBNC, células provenientes dessa reversão são potenciais fontes de inóculo para novas
88 infecções, podendo inclusive comprometer lotes de produtos vegetais comerciais (Ordax
89 *et al.*, 2009). Dessa forma, faz-se necessário uma detecção acurada da presença do agente
90 patogênico por meio de técnicas moleculares em conjunto com métodos microbiológicos
91 tradicionais de isolamento, uma vez que bactérias que se encontram em VBNC não
92 produzem colônias visíveis (Oliver, 2010). Portanto, é essencial que métodos que
93 permitam a detecção e quantificação de VBNC, como a quantificação por meio de qPCR
94 ou a extração de RNA para a verificação de expressão de genes alvos expressos na fase
95 de VBNC, sejam desenvolvidos (Postnikova *et al.*, 2015). Neste contexto, o presente
96 estudo teve como objetivo analisar a ocorrência de VBNC em isolados pigmentados e
97 apigmentados de *X. citri* pv. *anacardii* por meio de análises genômicas *in silico* e qPCR,
98 avaliando a capacidade dessas células causarem lesões patológicas em cajueiro.

99

100

101 **RESULTADOS**

102

103 **Determinação das fases de crescimento *in vitro***

104 Foram determinadas as fases de adaptação, exponenciais, estacionárias, declínio
105 e morte dos três isolados de *X. citri* pv. *anacardii*. Para o isolado CCRMTAQ13, às 24
106 horas após o cultivo (hac) foi possível observar o ápice da concentração bacteriana com
107 $1,15 \times 10^8$ UFC/mL, enquanto às 96 hac o isolado não formou mais colônias contáveis
108 (Figura 1). No isolado CCRMTAQ18, o ápice da curva de crescimento foi às 48 hac com
109 $0,36 \times 10^8$ UFC/mL, enquanto próximo às 72 hac já não havia formação de colônias
110 contáveis. No isolado IBSBF2579, foi possível observar que às 96 hac houve um aumento
111 significativo chegando a $0,38 \times 10^8$ UFC/mL, indicando a fase exponencial da bactéria
112 no meio.

113 Na curva de crescimento obtida a partir de densidades óticas, para o isolado
114 CCRMTAQ13 foi possível observar o crescimento da curva até às 96 hac, momento onde
115 se iniciou a fase estacionária. Para o isolados CCRMTAQ18 foi observado um aumento
116 até às 144 hac, enquanto para o isolado IBSBF2579 foi observado crescimento até as 72
117 hac.

118

119 **Caracterização *in silico***

120 A partir do levantamento bibliográfico e análises genômicas *in silico*, foram
121 identificados os genes candidatos para o uso nesse estudo. Por meio de análises nos
122 bancos de dados do Blast, Uniprot e Pfam e com auxílio programa Artemis (Carver *et al.*,
123 2012), foram anotados 13 diferentes genes de cópia única no genoma bacteriano,
124 previamente relatados como expressos na fase de VBNC (Tabela 1).

125

126 **Quantificação de células em *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* via qPCR**

127 Os dados obtidos por meio de qPCR demonstraram que o *primer relA* foi
128 amplificado de forma eficiente para todas as amostras utilizadas, demonstrado
129 especificidade na curva de Melt (Figura 2A), e pela quantidade de cópias do gene *relA*
130 para as amostras (Figura 2B), onde o isolado CCRMTAQ13 apresentou $4,86 \times 10^8$ e $2,68$
131 $\times 10^8$ cópias/mL, o isolado CCRMTAQ18 apresentou $2,55 \times 10^8$ e $2,38 \times 10^8$ cópias/mL e
132 o isolado IBSBF2579 apresentou $4,85 \times 10^8$ e $7,35 \times 10^8$, em suas fases exponencial e de
133 VBNC, respectivamente (Figura 3). Os valores quantificados por qPCR demonstraram

134 valores similares estatisticamente para CCRMTAQ13, CCRMTAQ18 e IBSBF2579 pelo
135 teste T de Student ($P \geq 0,05$), para as fases log e de morte.

136

137 **Parâmetros epidemiológicos**

138 Não foi observada interação significativa entre os fatores isolados e fases de
139 cultivo considerando o período de incubação da doença, sendo os fatores analisados
140 isoladamente. Nesse caso, foram observadas diferenças significativas apenas no fator
141 fases de cultivo, com a fase exponencial apresentando um período de incubação de 2,4
142 dias, enquanto os isolados inoculados na fase de VBNC apresentaram período de
143 incubação de 3,7 dias.

144 Na avaliação de severidade, foi observada interação significativa entre os fatores
145 avaliados (isolados e fases de inoculação) ($P \leq 0,05$), dessa forma os isolados
146 CCRMTAQ13 na fase de VBNC e IBSBF2579 na fase exponencial apresentaram as
147 médias mais baixas de severidade (3,96 mm² e 5,06 mm² respectivamente).

148

149

150 **DISCUSSÃO**

151

152 No comportamento da curva de crescimento baseado na densidade ótica, a longa
153 fase de adaptação dos três isolados contraria estudos com outras fitobactérias, como
154 *Acidovorax citrulli*, que estabilizou o crescimento próximo às 14h de cultivo (Burdman
155 *et al.*, 2005). Em IBSBF2579 a fase exponencial de desenvolvimento observada foi mais
156 tardia do que a esperada para bactérias fitopatogênicas (96hac), os isolados
157 CCRMTAQ13 e CCRMTAQ18 apresentaram suas fases exponenciais em momentos
158 próximos ao intervalo 24-48 hac previamente relatado como ótimo (Mariano e Souza,
159 2016). Quando analisados em conjunto, esses dados contribuíram para a escolha das fases
160 para a análise por qPCR, pois ao mesmo tempo em que a curva de crescimento se
161 estabilizou na diluição seriada, permaneceu em ascensão na densidade ótica nos isolados
162 CCRMTAQ13 e CCRMTAQ18 (Figura 1. A-D). No isolado IBSBF2579 as curvas
163 demonstram comportamento diferente, indicando a estabilização na curva de densidade
164 ótica e mantendo um maior período de adaptação no método de diluição seriada, no
165 entanto ainda foi possível observar o aumento da quantidade total de células, ao mesmo
166 tempo em que a curva de diluição seriada decresceu (Figura 1. E-F). Neste trabalho, a
167 quantificação da densidade ótica apresenta um meio de estimar a quantidade de células

168 totais presentes na suspensão, e a quantificação por diluição seriada possibilita a
169 estimativa da quantidade de células viáveis, dados confirmados quando aplicada qPCR,
170 que além quantificar com exatidão o número de células presente no meio, possibilita a
171 comparação com as outras técnicas aplicadas. Os resultados obtidos confirmam que a
172 utilização de curva de crescimento em meio líquido e contagem de colônias em meio
173 sólido são técnicas indispensáveis para verificação da cinética de desenvolvimento
174 bacteriano (Aburjaile *et al.*, 2016).

175 Os resultados obtidos a partir da análise de genes *in silico* apresentam funções
176 distintas em espécies pertencentes a mais de 10 gêneros diferentes, contudo a maioria
177 desses genes já foi previamente relatada de forma relacionada a mecanismos de
178 sobrevivência (Tabela 1).

179 Todas as amostras foram amplificadas para o gene *relA* (Figura 2), o qual foi
180 selecionado para o presente estudo por se tratar de um gene previamente utilizado de
181 forma bem-sucedida para detecção da fase de VBNC em isolados de *Vibrio cholerae*
182 (González-Escalona *et al.*, 2006). O gene *relA* é responsável pela síntese de guanosina
183 pentafosfato sintetase, que está relacionada à adaptação de sinais ambientais, promovendo
184 resistência a condições adversas, como estresse nutricional, exposição a antibióticos e
185 inibidores metabólicos (Asakura *et al.*, 2007; Potrykuse Cashel, 2016).

186 As análises via qPCR demonstraram quantidade de células viáveis muito maior
187 do que àquelas observadas nos ensaios de quantificação por diluição seriada para os
188 isolados CCRMAQT13, CCRMAQT18, IBSBF2579, pois o número de cópias foi
189 amplamente superior à concentração bacteriana determinada por meio da contagem em
190 placa de Petri. Os valores superiores nos isolados CCRMTAQ13, CCRMTAQ18 e
191 IBSBF2579 demonstram a presença de VBNC nos três isolados de *X. citri* pv. *anacardii*
192 avaliados, demonstrando pela primeira vez a ocorrência desse mecanismo nesse micro-
193 organismo.

194 As médias dos períodos de incubação dos três isolados inoculados em mudas de
195 cajueiro (IBSBF2579, CCRMTAQ13 e CCRMTAQ18) diferiram apenas quando
196 comparadas as fases logarítmica e de morte, e apresentaram resultados compatíveis com
197 estudos prévios de período de incubação, onde foram observados para CCRMTAQ13 e
198 CCRMTAQ18 3,79 e 2,79 dias, respectivamente (Gama *et al.*, 2011). A recuperação de
199 bactérias fitopatogênicas em estado de VBNC *in vivo* já foi relatada previamente em
200 *Xanthomonas*, demonstrando a capacidade de *X. citri* subsp. *citri* reverter o estado e
201 causar sintomas típicos, de forma semelhante à inoculação em fase exponencial (Del

202 Campo *et al.*, 2009). Adicionalmente, a sobrevivência por meio de VBNC e a sua alta
203 capacidade de causar doença sugere que órgãos infectados podem funcionar plenamente
204 como fonte de inóculo no momento de reversão do estado (Ordax *et al.*, 2009).

205 A comparação entre os dados quantitativos indica que *X. citri* pv. *anacardii*
206 provavelmente se mantém viável, apesar da capacidade de cultivo ser perdida na fase de
207 morte. O estado de VBNC é comumente induzido por condições de estresse, como
208 radiação UV (Zhang *et al.*, 2015), déficit de nutrientes (Santander *et al.*, 2018),
209 temperaturas extremas (Lowder *et al.*, 1999), pH desfavorável (Cunningham *et al.*, 2009;
210 Jiang *et al.*, 2016), estresse oxidativo (Nowakowska e Oliver, 2013) e agentes químicos
211 antibacterianos, especialmente aqueles derivados de cobre (Jiang *et al.*, 2016), dessa
212 forma a caracterização do mecanismo de VBNC em *X. citri* pv. *anacardii* demonstra um
213 novo horizonte de possibilidades no que tange à detecção do patógeno em materiais de
214 propagação, pois os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que os métodos
215 tradicionais de diagnose, quando utilizados de forma isolada, podem subestimar a
216 viabilidade da bactéria a ser detectada (Aburjaile *et al.*, 2016). Portanto, os resultado
217 obtido no presente estudo demonstram claramente a necessidade da integração de técnicas
218 convencionais e moleculares para a determinação da presença ou ausência de agentes
219 patogênicos em amostras vegetais.

220

221 **PROCEDIMENTOS**

222

223 **Isolados bacterianos**

224 Foram utilizados dois isolados pigmentados (CCRMTAQ13 e CRMTAQ18) e um
225 apigmentado (IBSBF2579) de *X. citri* pv. *anacardii*. Esses isolados possuem genomas
226 sequenciados e depositados no banco de dados do National Center for Biotechnology
227 Information – NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), com os seguintes códigos de
228 acesso: GCA_002898475.1, GCA_002898415.1 e GCA_002837255.1, para os isolados
229 CCRMTAQ13, CRMTAQ18 e IBSBF2579, respectivamente. Esses isolados encontram-
230 se depositados na Coleção de Culturas Rosa Mariano do Laboratório de Fitobacteriologia
231 (LAFIBAC) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e foram
232 recuperados pelo cultivo em placas de Petri contendo meio NYDA (20g/L ágar, 10g/L
233 dextrose, 5g/L extrato de levedura, 3g/L extrato de carne e 5g/L de peptona) à 29°C por
234 36 h, em estufas do tipo B.O.D. (Biochemistry Oxygen Demand).

235

236 **Determinação das fases de crescimento *in vitro***

237 Foi preparada a suspensão de cada isolado em água destilada esterilizada (ADE),
238 ajustando-se a concentração com auxílio de fotocolorímetro (Analyser®) para $A_{570} = 0,06$,
239 que corresponde a 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. Posteriormente, 1 mL
240 da suspensão bacteriana foi adicionado a tubos de ensaio contendo 9 mL do meio líquido
241 NYD (NYDA sem ágar), com posterior incubação em estufas do tipo B.O.D. à 29 °C. A
242 cada 24 horas, durante 7 dias, a concentração da suspensão nos tubos foi determinada
243 retirando-se alíquotas de 5 mL da suspensão para leitura da absorbância a 570 nm.
244 Simultaneamente, foram realizadas diluições seriadas retirando-se alíquotas de 1 mL da
245 suspensão e diluindo em ADE até 10^{-7} , plaqueando-se 1mL das três últimas diluições em
246 placas de Petri contendo meio NYDA e espalhando a suspensão com auxílio de uma alça
247 de Drigalski. As colônias formadas foram contadas às 48 horas após o plaqueamento para
248 determinação da concentração de células bacterianas.

249 O experimento foi realizado em delineamento experimental inteiramente
250 casualizado, com 21 tubos de ensaio para cada isolado. A cada dia de avaliação, foram
251 realizadas 7 leituras de absorbância e a quantificação da concentração bacteriana em seis
252 placas de Petri para cada diluição quantificada (10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}). O cálculo da
253 concentração foi realizado pela fórmula $\text{UFC/mL} = \text{número médio de colônias} \times \text{fator de}$
254 $\text{diluição da amostra} \times \text{fator de correção}$, onde o fator de diluição corresponde à potência
255 de base 10 na qual a diluição foi plaqueada e o fator de correção corresponde a 10, que
256 por sua vez refere-se ao fato de terem sido plaqueados apenas 0,1 mL de suspensão.
257 Posteriormente, os dados foram convertidos para uma mesma potência de base 10 e
258 utilizado para construção de gráficos de crescimento para determinação das fases
259 exponencial e de morte. O experimento foi realizado duas vezes.

260

261 **Identificação *in silico* de genes relacionados ao estado VBNC**

262 Foi realizado levantamento bibliográfico em artigos científicos contidos no banco
263 de dados das plataformas PubMed, Web of Science e SCOPUS, visando a identificação
264 de genes previamente relatados como expressos durante o estado de VBNC para detectar
265 genes de cópia única no genoma e em seguida fazer o desenho de primers para
266 quantificação de cópias via qPCR.

267 Os genomas já sequenciados dos isolados pigmentados CCRMTAQ13
268 (GCA_002898475.1) e CCRMTAQ18 (GCA_002898415.1) (Gama *et al.*, 2018) e do
269 isolado IBSBF2579 (GCA_002837255.1) (Silva Junior *et al.*, 2018) foram analisados

270 para identificação de supostos genes relacionados ao estado VBNC. O genoma dos
271 isolados CCRMTAQ13 e CCRMTAQ18 foram montados pelo programa SPAdes 3.13
272 (Nurk *et al.*, 2013) e anotados automaticamente com o auxílio da plataforma RAST
273 (Overbeek *et al.*, 2014). Esses isolados passaram pelo alinhamento dos genes expressos
274 em VBNC (realizado com o auxílio da plataforma BLASTn) seguido pela anotação
275 manual utilizando o banco de dados da plataforma Uniprot (Altschul *et al.*, 1990; Bairoch
276 *et al.*, 2005). Em seguida, com o auxílio do programa Artemis (Carver *et al.*, 2012),
277 posteriormente foram desenhados primers através da plataforma Primer-BLAST. O gene
278 escolhido foi *relA*, cujos primers desenhados apresentam as sequências F:
279 GATCGAAATCCAGATCCGTACC e R: TGCCGCCTTCCTTGTATTT.
280 Posteriormente, foi realizado um teste de qPCR *in silico* utilizando a plataforma Primer-
281 BLAST (Ye *et al.*, 2012).

282

283 **Extração de DNA**

284 O DNA dos isolados foi extraído de acordo com metodologia previamente descrita
285 (Ausubel *et al.* 1992). Foram extraídas 6 amostras nos tempos correspondentes às fases
286 logarítmica e de morte para os três isolados. Para o isolado CCRMTAQ13, foram
287 utilizados os tempos de cultivo de 24 e 96 horas, para o isolado CCRM18, foram
288 utilizados os tempos de 48 e 72 horas, e para o isolado IBSBF2579, foram utilizados os
289 tempos de 96 e 168 horas. As coletas foram realizadas em triplicatas biológicas e técnica,
290 resultando em 36 amostras extraídas (Tabela 4). O DNA foi quantificado de acordo com
291 a metodologia descrita anteriormente (Gama *et al.*, 2011).

292

293 **Determinação de VBNC em *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* via qPCR**

294 A reação quantificou o gene *relA*, que possui cópia única no genoma de *X. citri*
295 pv. *anacardii*. O DNA dos isolados foi extraído de acordo com a metodologia descrita
296 por Gama *et al.* (2011). Cada poço da reação de qPCR foi preenchido com 10µL de
297 GoTaq qPCR Master Mix (2X), 2µL dos primers, 5µL de água livre de nucleases e 3µL
298 de DNA extraído diluído. Para a reação de qPCR foi utilizado QuantStudio 5 Real-Time
299 PCR System (ThermoFischer), iniciando a amplificação com 2 min a 95 °C, e 45 ciclos
300 de 15 min a 98°C seguidos de 1 min a 60°C. Foi realizado um ajuste com uma curva
301 padrão desenvolvida com base na diluição seriada da amostra mais concentrada de DNA
302 extraído, sendo a curva padrão determinada de acordo com os valores diluídos do DNA
303 extraído x 1000ng/uL. O cálculo de número total de cópias/mL foi determinado a partir

304 da relação do número de pares de base do gene *relA* x número de pares de base do genoma
305 e a concentração de DNA em ng/ μ L por amostra. O limite de ciclos (*Cycle Threshold*) foi
306 determinado após o ajuste manual do número limite da parte linear das curvas de
307 amplificação logarítmica da qPCR (Aburjaile *et al.*, 2016). Os procedimentos foram
308 realizados em triplicata para todas as amostras. Foi aplicado um teste em branco como
309 parâmetro para verificar a confiabilidade dos dados obtidos. Posteriormente, i aplicado o
310 teste T de Student ($P \leq 0,05$) para a avaliação da diferença entre as quantificações por
311 meio de diluição seriada e por qPCR para cada isolado, nas fases exponencial e de morte.
312 Os poços foram preenchidos conforme disposto na Figura 4, sendo realizada diluição
313 seriada para estabelecimento da curva padrão da reação (poços A1-A12), dois poços com
314 teste em branco (D11-D12) e 48 amostras de DNA extraído dos três isolados nas fases
315 logarítmica e de morte (poços E1-H12). A fase de VBNC foi determinada comparando-
316 se a quantidade de cópias do gene *relA*/mL nas fases exponencial e de morte, em relação
317 às quantidades de células totais observadas por meio da densidade ótica e de UFC/mL
318 obtida por diluição seriada nos isolados (Aburjaile *et al.*, 2016).

319

320

321 **Caracterização patológicas dos isolados**

322 Os isolados CCRMTAQ 13, CCRMTAQ 18 e IBSBF 2579 foram cultivados em
323 meio NYD durante 24, 48 e 96 hac para a fase exponencial, e às 96, 72 e 168 hac, para a
324 fase de VBNC, respectivamente. As suspensões bacterianas foram obtidas a partir da
325 centrifugação do meio NYD a 12.000 rpm, seguido de retirada do meio sobrenadante,
326 com o auxílio de um fotocolorímetro, o material precipitado foi ajustado para a $A_{570nm} =$
327 0,06. Cada isolado foi inoculado nas quatro folhas apicais de mudas de cajueiro cultivados
328 em casa de vegetação, por meio do método da infiltração foliar (Gama *et al.*, 2011).
329 Folhas tratadas similarmente com ADE foram utilizadas como controle. Após as
330 inoculações, as plantas foram mantidas em casa de vegetação ($28 \pm 2^\circ\text{C}$, UR 65%).

331 Os parâmetros epidemiológicos avaliados foram o período de incubação, definido
332 como intervalo de tempo, em dias, entre a inoculação e o desenvolvimento dos primeiros
333 sintomas, e severidade final, avaliada aos vinte dias após a inoculação (dai), por meio da
334 medição da área (mm^2) de lesão com auxílio de um paquímetro (Gama *et al.*, 2011). Cada
335 tratamento foi composto por quatro repetições, sendo cada repetição composta por três
336 pontos de inoculação nas quatro folhas do ápice das plantas. Os dados foram comparados
337 de acordo com os isolados e as fases exponencial e de VBNC na curva de crescimento. O

338 experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial
339 (isolados x fases de crescimento). As médias foram avaliadas quanto ao atendimento aos
340 pressupostos da análise de variância (ANAVA), para a comparação de isolados, e teste T
341 de Student, para a comparação de fases de crescimento. Quando aplicada a ANAVA, foi
342 utilizado o teste de Tukey para a separação de médias. Em todo o experimento, foi
343 utilizado nível de significância de 5% ($P>0,05$) (AgroEstat, v.1.1.0.712rev77).

344

345 **AGRADECIMENTOS**

346 Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
347 Tecnológico CNPq pela bolsa de estudos concedida a Lucas Pontes de Lucena.

348 REFERÊNCIAS

349

350 **Aburjaile, F.F., Madec, M.-N., Parayre, S., Miyoshi, A., Azevedo, V., Loir, Y.L. e**
351 **Falentin, H.** (2016) The long-term survival of *Propionibacterium freudenreichii* in a
352 context of nutrient shortage. *Journal of Applied Microbiology* **120**, 432–440.

353 **Alexander, E., Pham, D. e Steck, T.R.** (1999) The Viable-but-Nonculturable Condition
354 Is Induced by Copper in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*.
355 *Appl Environ Microbiol* **65**, 3754–3756.

356 **Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. e Lipman, D.J.** (1990) Basic local
357 alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410.

358 **Amel, D. e Amina, B.** (2008) Resuscitation of Seventeen-year Stressed *Salmonella*
359 *typhimurium*. *Oceanological and Hydrobiological Studies* **37**, 69–82.

360 **American Society for Microbiology., Microbiology, A.S. for, Bergey, D.H. e Breed,**
361 **R.S.** (1957) Bergey's manual of determinative bacteriology, 7th ed., Baltimore: Williams
362 & Wilkins Co.

363 **Asakura, H., Ishiwa, A., Arakawa, E., Makino, S., Okada, Y., Yamamoto, S. e Igimi,**
364 **S.** (2007) Gene expression profile of *Vibrio cholerae* in the cold stress-induced viable but
365 non-culturable state. *Environmental Microbiology* **9**, 869–879.

366 **Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J.**
367 **A., e Struhl, K.** (1992) *Current protocols in molecular biology*. Vol. 1. New York,
368 NY: Greene Publishing Association.

369 **Bairoch, A., Apweiler, R., Wu, C.H., et al.** (2005) The Universal Protein Resource
370 (UniProt). *Nucleic Acids Res* **33**, D154–D159.

371 **Campo, R.D., Russi, P., Mara, P., Mara, H., Peyrou, M., León, I.P.D. e Gaggero, C.**
372 (2009) *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* enters the VBNC state after copper treatment
373 and retains its virulence. *FEMS Microbiology Letters* **298**, 143–148.

374 **Cardoso, J. E.; Viana, F. M. P.; Freire, F. das C. O.; Martins, M. V. V.** Doenças do
375 cajueiro. (2013) In: Agronegócio caju: práticas e inovações. (Araújo, J. P. P., ed) pp. 217-
376 238. Brasília, DF: Embrapa.

377 **Carver, T., Harris, S.R., Berriman, M., Parkhill, J. e McQuillan, J.A.** (2012) Artemis:
378 an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based
379 experimental data. *Bioinformatics* **28**, 464–469.

380 **Cunningham, E., O'Byrne, C. e Oliver, J.D.** (2009) Effect of weak acids on *Listeria*
381 monocytogenes survival: Evidence for a viable but nonculturable state in response to low
382 pH. *Food control*.

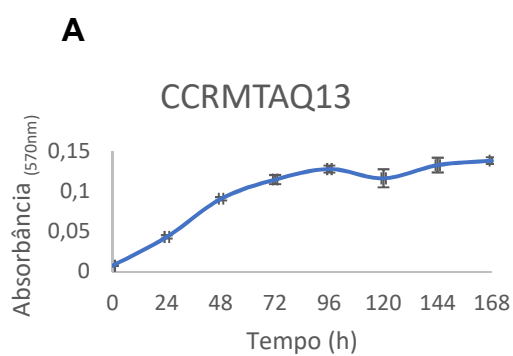
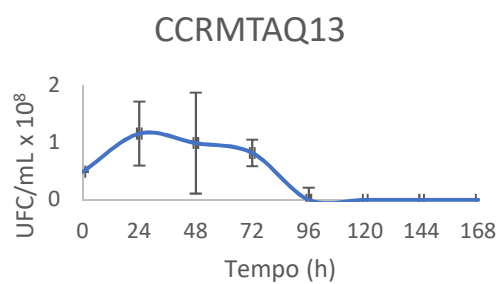
383 **Darling, A.C.E., Mau, B., Blattner, F.R. e Perna, N.T.** (2004) Mauve: Multiple
384 Alignment of Conserved Genomic Sequence With Rearrangements. *Genome Res.* **14**,
385 1394–1403.

- 386 **Eisen, J.A., Heidelberg, J.F., White, O. e Salzberg, S.L.** (2000) Evidence for symmetric
387 chromosomal inversions around the replication origin in bacteria. *Genome Biology*, 1,
388 1465-6906.
- 389 **Gama, M.A.S., Mariano, R.L.R., Viana, F.M.P., Ferreira, M.A.S.V. e Souza, E.B.**
390 (2011) Polyphasic Characterization of Pigmented Strains of *Xanthomonas* Pathogenic to
391 Cashew Trees. *Plant Disease* **95**, 793–802.
- 392 **Gama, M.A.S., Felix, K.C. da S., Silva, A.M.F. da, Santos, L.A. dos, Santos,**
393 **M.M.B. dos and Souza, L.J. do N.** (2015) O cajueiro e suas fitobacterioses: mancha
394 angular e mancha de *Xanthomonas*. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência*
395 *Agronômica* **10**, 123–142.
- 396 **Ghezzi, J.I. e Steck, T.R.** (1999) Induction of the viable but non-culturable condition in
397 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in liquid microcosms and sterile soil. *FEMS*
398 *Microbiology Ecology* **30**, 203–208.
- 399 **Golmohammadi, M., Cubero, J., López, M.M. e Llop, P.** (2013) The Viable but Non-
400 culturable State in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* is a Reversible State Induced by Low
401 Nutrient Availability and Copper Stress Conditions. **7**, 1019-1029.
- 402 **González-Escalona, N., Fey, A., Höfle, M.G., Espejo, R.T. e A. Guzmán, C.** (2006)
403 Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis of *Vibrio cholerae*
404 cells entering the viable but non-culturable state and starvation in response to cold shock.
405 *Environmental Microbiology* **8**, 658–666.
- 406 **Kan, Y., Jiang, N., Xu, X., Lyu, Q., Gopalakrishnan, V., Walcott, R., Burdman, S.,**
407 **Li, J. e Luo, L.** (2019) Induction and Resuscitation of the Viable but Non-culturable
408 (VBNC) State in *Acidovorax citrulli*, the Causal Agent of Bacterial Fruit Blotch of
409 Cucurbitaceous Crops. *Front. Microbiol.* **10**.
- 410 **Kong, H.G., Bae, J.Y., Lee, H.J., Joo, H.J., Jung, E.J., Chung, E. e Lee, S.-W.** (2014)
411 Induction of the Viable but Nonculturable State of *Ralstonia solanacearum* by Low
412 Temperature in the Soil Microcosm and Its Resuscitation by Catalase. *PLOS ONE* **9**,
413 e109792.
- 414 **Lowder, M.W., Unge, A., Maraha, N., Jansson, J.K., Swiggett, J.P. e Oliver, J.D.**
415 (1999) A 506 *Pseudomonas fluorescens* GFP-Tagged Fluorescent Protein (GFP)
416 Fluorescence in Viable-but-Nonculturable State on Green Effect of Starvation and the.
- 417 **Mariano, R. L. R., e Silveira, E. B.** (2016) Manual de práticas em fitobacteriologia. 4th
418 ed. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- 419 **Meng, L., Alter, T., Aho, T. e Huehn, S.** (2015) Gene expression profiles of *Vibrio*
420 *parahaemolyticus* in viable but non-culturable state. *FEMS Microbiol. Ecol.* **91**.
- 421 **Mytilinaios, I., Salih, M., Schofield, H.K. e Lambert, R.J.W.** (2012) Growth curve
422 prediction from optical density data. *International Journal of Food Microbiology* **154**,
423 169–176.
- 424 **NCBI - National Center for Biotechnology Information.** (2019) NCBI genome. Available
425 at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/527?> [accessed on Jul 16, 2019]

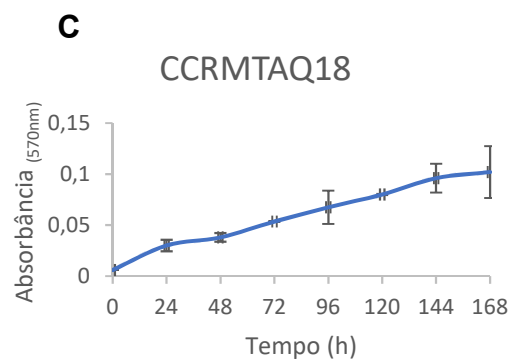
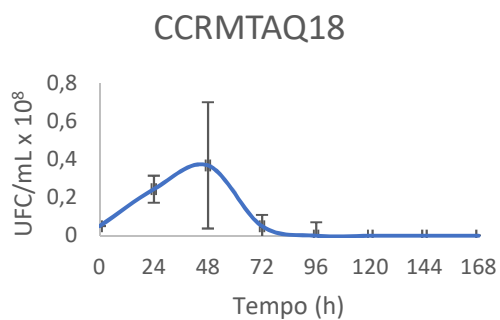
- 426 **Nowakowska, J. e Oliver, J.D.** (2013) Resistance to environmental stresses by *Vibrio*
427 *vulnificus* in the viable but nonculturable state. *FEMS Microbiol Ecol* **84**, 213–222.
- 428 **Oliver, J.D.** (2010) Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic
429 bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **34**, 415–425.
- 430 **Oliver, J.D.** (2000) The Public Health Significance of Viable but Nonculturable Bacteria.
431 In *Nonculturable Microorganisms in the Environment*. (Colwell, R.R. and Grimes, D.J.,
432 eds), pp. 277–300. Boston, MA: Springer US.
- 433 **Oliver, J.D.** The Viable but Nonculturable State in Bacteria. *J. Microbiol.* **43**, 8.
- 434 **Ordax, M., Biosca, E.G., Wimalajeewa, S.C., López, M.M. e Marco-Noales, E.** (2009)
435 Survival of *Erwinia amylovora* in mature apple fruit calyces through the viable but
436 nonculturable (VBNC) state. *Journal of Applied Microbiology* **107**, 106–116.
- 437 **Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G.D., et al.** (2014) The SEED and the Rapid Annotation
438 of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucl. Acids Res.* **42**, 206–
439 214.
- 440 **Palmieri, A.C.B., Amaral, A.M. do, Homem, R.A. e Machado, M.A.** (2010)
441 Differential expression of pathogenicity- and virulence-related genes of *Xanthomonas*
442 *axonopodis* pv. *citri* under copper stress. *Genetics and Molecular Biology* **33**, 348–353.
- 443 **Potrykus, K. e Cashel, M.** (2016) Preferential Cellular Accumulation of ppGpp or
444 pppGpp in *Escherichia Coli*. In *Stress and Environmental Regulation of Gene Expression*
445 *and Adaptation in Bacteria*., pp. 479–488. John Wiley & Sons, Ltd.
- 446 **Saddler, G.S. e Bradbury, J.F.** (2005) Xanthomonadales ord. nov. In *Bergey's*
447 *Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two. The Proteobacteria Part B. The*
448 *Gammaproteobacteria*. (Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., Garrity, G.M., Boone,
449 D.R., De Vos, P., Goodfellow, M., Rainey, F.A., and Schleifer, K.-H., eds), pp. 63–122.
450 Boston, MA: Springer US.
- 451 **Santander, R.D., Figàs-Segura, À. e Biosca, E.G.** (2018) *Erwinia amylovora* catalases
452 KatA and KatG are virulence factors and delay the starvation-induced viable but non-
453 culturable (VBNC) response. *Molecular Plant Pathology* **19**, 922–934.
- 454 **Su, X., Guo, L., Ding, L., Qu, K. e Shen, C.** (2016) Induction of Viable but
455 Nonculturable State in *Rhodococcus* and Transcriptome Analysis Using RNA-seq. *PLoS*
456 *One* **11**.
- 457 **Su, X., Zhang, S., Mei, R., Zhang, Y., Hashmi, M.Z., Liu, J., Lin, H., Ding, L. e Sun,**
458 **F.** (2018) Resuscitation of viable but non-culturable bacteria to enhance the cellulose-
459 degrading capability of bacterial community in composting. *Microbial Biotechnology* **11**,
460 527–536.
- 461 **Trevors, J.T.** (2011) Viable but non-culturable (VBNC) bacteria: Gene expression in
462 planktonic and biofilm cells. *J. Microbiol. Methods* **86**, 266–273.
- 463 **Um, H.Y., Kong, H.G., Lee, H.J., Choi H. K., Park E. J., Kim S. T., Murugiyani, S.,**
464 **Chung, E., Kang, K. Y., Lee, S.** (2013) Altered Gene Expression and Intracellular

- 465 Changes of the Viable But Nonculturable State in *Ralstonia solanacearum* by Copper
466 Treatment. *Plant Pathol J* 29, 374–385.
- 467 **Viana, F.M.P., Cardoso, J.E., Saraiva, H. A. O., Ferreira, M. a. S.V., Mariano,**
468 **R.L.R. e Trindade, L.C.** (2007) First Report of a Bacterial Leaf and Fruit Spot of Cashew
469 Nut (*Anacardium occidentale*) Caused by *Xanthomonas campestris* pv.
470 *mangiferaeindicae* in Brazil. *Plant Disease* **91**, 1361–1361.
- 471 **Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. e Madden, T.L.** (2012)
472 Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction.
473 *BMC Bioinformatics* **13**, 134.
- 474 **Zhao, X., Zhong, J., Wei, C., Lin, C.-W. e Ding, T.** (2017) Current Perspectives on
475 Viable but Non-culturable State in Foodborne Pathogens. *Front Microbiol* **8**.

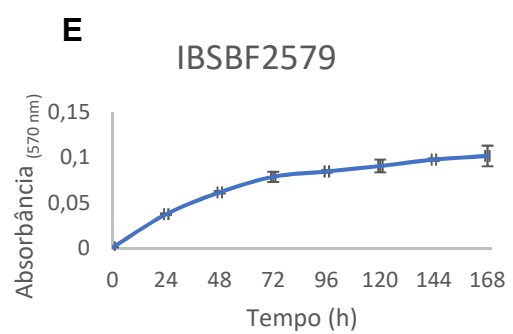
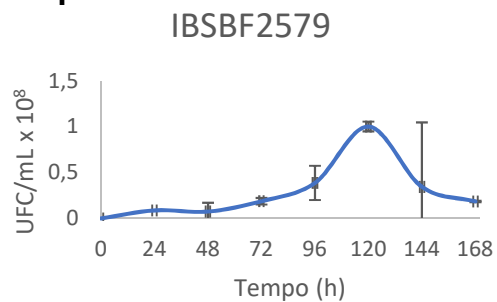
476

**B**

477

**D**

478

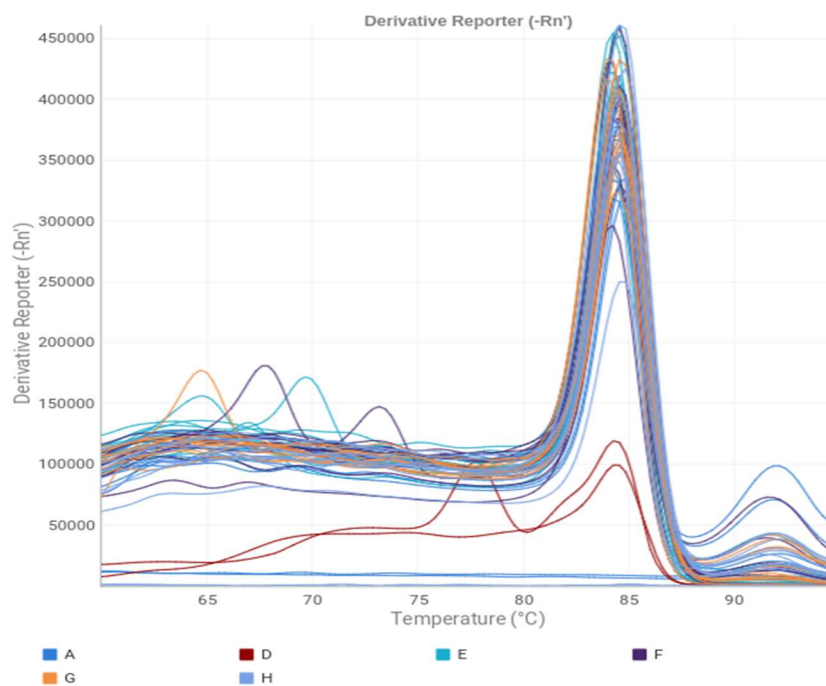
**F**

479

480 **Fig. 1** Curvas de crescimento de absorbância ($DO_{570\text{nm}}$) e UFC/mL x 10^8 dos isolados CCRMTAQ13 (A e
 481 B), CCRMTAQ18 (C e D) e IBSBF2579 (E e F).

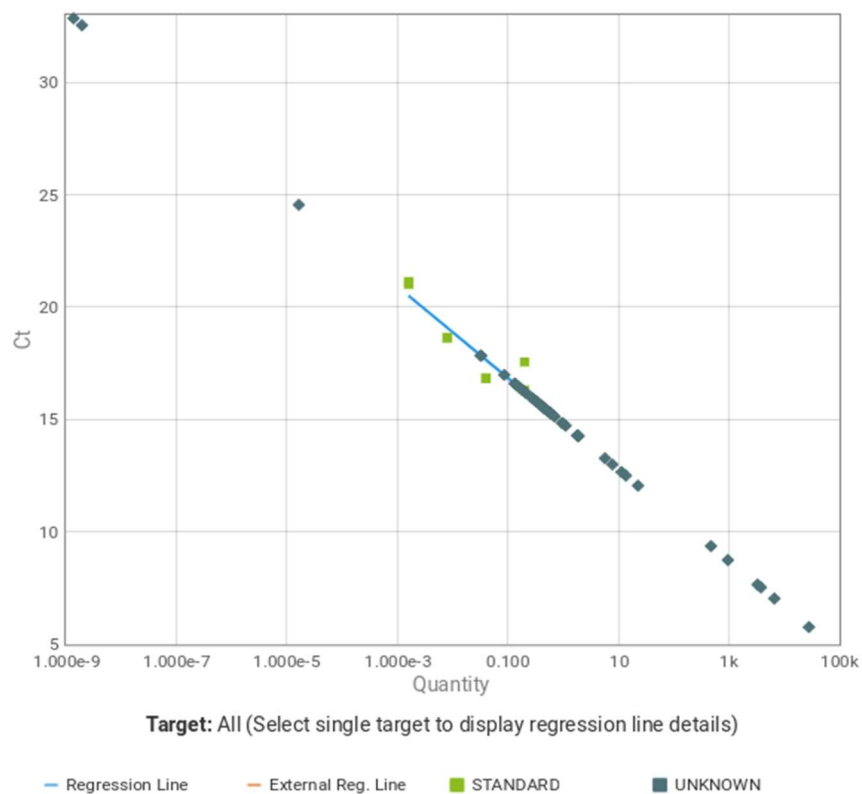
482

A



483

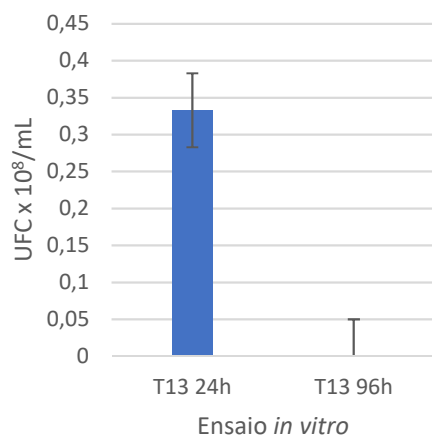
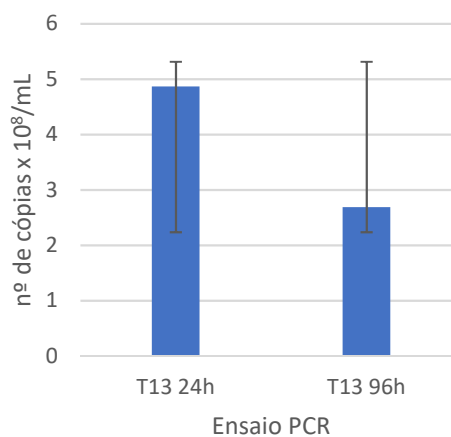
B



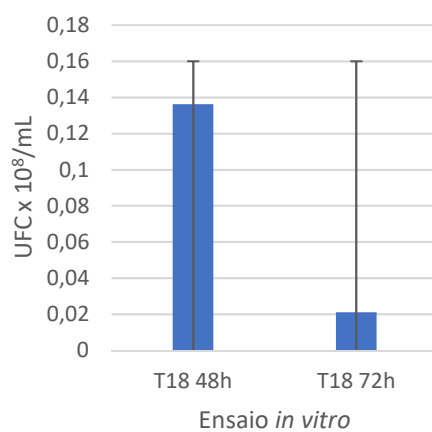
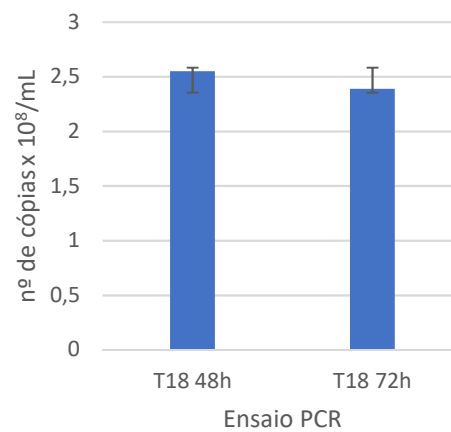
484

485 **Fig. 2** Amplificação das amostras para o gene *relA* em qPCR. A. Curva de Melt, B. Quantidade de cópias
 486 do gene *relA* para todas as amostras.

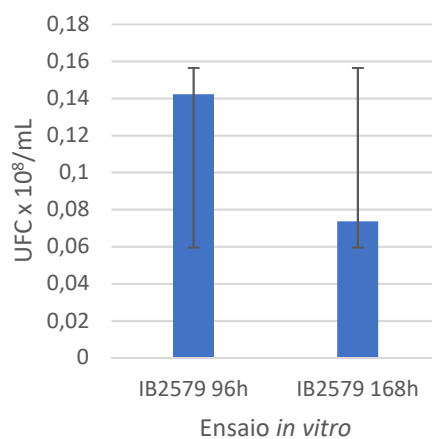
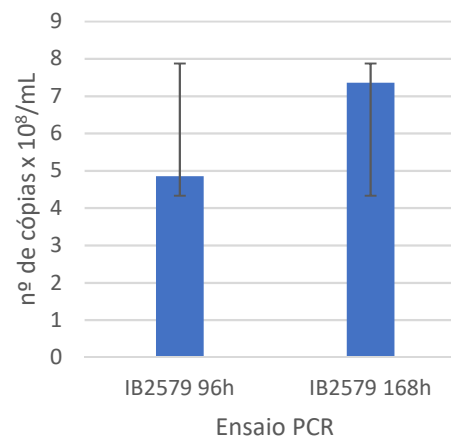
487

A**B**

488

C**D**

489

E**F**

490

491 **Fig. 3 Quantidade de unidades formadoras de colônias por mL, de acordo com o método de qPCR:**
 492 (A) isolado CCRMTAQ13 (ds), (B) isolado CCRMTAQ13 (qPCR), (C) isolado CCRMTAQ18 (ds), (D)
 493 CCRMTAQ18 (qPCR), (E) isolado IBSBF2579 (ds), (F) isolado IBSBF2579 (qPCR).

494

495 **Tabela 1.** Lista de genes detectados como diferencialmente expressos na presença do estado de VBNC em
 496 outras bactérias fitopatogênicas. Estes genes foram encontrados nos genomas dos isolados caracterizados
 497 neste trabalho, tais que: CRMTAQ13, CCRMTAQ18 e IBSBF 2579.

Gene	Produto	Referência
<i>fliG</i>	Proteína flagelar FliG	
<i>relA</i>	(P) ppGpp sintetase	ASAKURA et al., 2007
<i>omp</i>	Proteína exterior da membrana	
<i>rps</i>	Proteína ribossomal 30S	UM et al., 2013
<i>dps</i>	DNA-binding ferritin-like protein (Oxidative damage protectant)	
<i>mobA</i>	Molibdênio cofator guaniltransferase	YARON; MATTHEWS, 2002
<i>soxR</i>	Transcriptional regulator soxR family	
<i>katG</i>	Catalase-peroxidase	CHEN et al., 2018
<i>gltB</i>	Glutamato sintase alfa subunidade	
<i>gltD</i>	Glutamato sintase beta subunidade	MENG et al., 2015
<i>pilM</i>	Tipo IV pilus assembly proteína	
<i>hfq</i>	Proteína de ligação de RNA Hfq	
<i>murG</i>	UDP-N-acetylglucosamine--N- acetylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N- acetylglucosamine transferase	JAMEELAH et al, 2017

498

499 **Tabela 2.** Caracterização de severidade (mm²) aos vinte dias após a inoculação, utilizando os
 500 isolados de *X. citri* pv. *anacardii* CCRMTAQ13, CCRMTAQ18 e IBSBF2579, inoculados nas
 501 respectivas fases exponencial (24h, 48h e 96h respectivamente) e de VBNC (96h, 72h, e 168h
 502 respectivamente)

Isolados	Fase log	Fase de VBNC
CCRMTAQ13	6,79 aA	3,96 cB
IBSBF2579	5,06 bB	7,17 aA
CCRMTAQ18	6,72 aA	5,82 bA
CV (%)		10,69

503 ^x Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não se diferenciam
 504 pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

505
 506

507 **Tabela 4.** Dados brutos utilizados para a quantificação de cópias em qPCR

Amostra	Score de Amp	Status de Amplificação	Cq	Cq - Média	Quantificação	Nº de copias de Xanthomonas	Quantificação Média	Intercept	R-Quadrado	Slope	Padrão
No Sample	0	No Amp	Undetermined	-	1	1,78E+09	-	148.195	0,8293	-20.345	0,077
No Sample	0	No Amp	Undetermined	-	1	1,78E+09	-	148.195	0,8293	-20.345	0,077
No Sample	1.566	Amp	17.563	16.939	0,2	3,56E+08	-	148.195	0,8293	-20.345	0,077
No Sample	1.605	Amp	16.316	16.939	0,2	3,56E+08	-	148.195	0,8293	-20.345	0,077
No Sample	1.706	Amp	16.841	16.838	0,04	71233920	-	148.195	0,8293	-20.345	0,077
No Sample	1.708	Amp	16.835	16.838	0,04	71233920	-	148.195	0,8293	-20.345	0,077
No Sample	1.709	Amp	18.661	18.645	0,008	14246784	-	148.195	0,8293	-20.345	0,077
No Sample	1.717	Amp	18.628	18.645	0,008	14246784	-	148.195	0,8293	-20.345	0,077
No Sample	1.726	Amp	21.143	21.077	0,0016	2849357	-	148.195	0,8293	-20.345	0,077
No Sample	1.721	Amp	21.012	21.077	0,0016	2849357	-	148.195	0,8293	-20.345	0,077
No Sample	1.633	Amp	9.380	15.267	47.180.493	8,40E+16	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
CN	1.571	Amp	32.538	15.267	1,96E-02	34818262	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
CN	1.508	Amp	32.843	15.267	1,38E-02	24637078	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
TAQ13 24h	1.655	Amp	14.298	15.267	1.804.369	3,21E+15	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
TAQ13 24h	1.679	Amp	13.009	15.267	7.762.733	1,38E+16	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
TAQ13 24h	1.643	Amp	12.064	15.267	22.604.507	4,03E+16	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077

TAQ13 24h	1.577	Amp	15.497	15.267	0,46443567	8,27E+08	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
TAQ13 24h	1,69	Amp	15.467	15.267	0,4803301	8,55E+08	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
TAQ13 24h	1.678	Amp	14.842	15.267	0,9744548	1,74E+09	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
TAQ13 24h	1.594	Amp	14.263	15.267	18.778.512	3,34E+16	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
TAQ13 24h	1.697	Amp	15.985	15.267	0,2675067	4,76E+08	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
TAQ13 24h	1.705	Amp	15.323	15.267	0,5654844	1,01E+09	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
TAQ18 48h	1,69	Amp	15.779	15.267	0,33745983	6,01E+08	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
TAQ18 48h	1.702	Amp	15.527	15.267	0,44888884	7,99E+08	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
TAQ18 48h	1.715	Amp	13.284	15.267	5.687.507	1,01E+16	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
TAQ18 48h	1.563	Amp	14.295	15.267	18.109.012	3,22E+16	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
TAQ18 48h	1.698	Amp	15.922	15.267	0,28716755	5,11E+08	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
TAQ18 48h	1.625	Amp	15.133	15.267	0,70147157	1,25E+09	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
TAQ18 48h	1.361	Amp	17.849	15.267	0,032415807	57727625	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
TAQ18 48h	1.706	Amp	15.659	15.267	0,3867414	6,89E+08	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
TAQ18 48h	1.637	Amp	15.224	15.267	0,63251716	1,13E+09	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
TAQ18 72h	1.614	Amp	15.340	15.267	0,55460054	9,88E+08	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077

TAQ18 72h	1.629	Amp	15.801	15.267	0,32929787	5,86E+08	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
TAQ18 72h	1.721	Amp	17.849	15.267	0,03241231	57721397	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
TAQ18 72h	1.545	Amp	16.573	15.267	0,13736752	2,45E+08	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
TAQ18 72h	1,7	Amp	15.521	15.267	0,45211703	8,05E+08	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
TAQ18 72h	1,57	Amp	14.733	15.267	11.024.555	1,96E+16	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
TAQ18 72h	1.543	Amp	16.606	15.267	0,13241585	2,36E+08	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
TAQ18 72h	1.667	Amp	16.238	15.267	0,20078865	3,58E+08	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
TAQ18 72h	1.548	Amp	7.047	15.267	66.107.085	1,18E+17	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
TAQ13 96h	1.685	Amp	14.272	15.267	18.592.023	3,31E+16	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
TAQ13 96h	0	Inconclusive	24.552	15.267	1,64E+01	2,93E+10	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
TAQ13 96h	1.647	Amp	16.989	15.267	0,08587888	1,53E+08	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
TAQ13 96h	1.691	Amp	16.195	15.267	0,21087457	3,76E+08	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
TAQ13 96h	1.716	Amp	16.324	15.267	0,18213724	3,24E+08	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
TAQ13 96h	1,67	Amp	15.819	15.267	0,32276544	5,75E+08	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
IBSBF 96h	1,41	No Amp	16.475	15.267	0,1535964	2,74E+08	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
IBSBF 96h	1.514	Amp	5.775	15.267	27.891.666	4,97E+16	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077

IBSBF 96h	1.575	Amp	16.312	15.267	0,18457617	3,29E+08	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
IBSBF 96h	1,65	Amp	15.341	15.267	0,5539449	9,86E+08	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
IBSBF 96h	1.634	Amp	12.671	15.267	11.375.313	2,03E+16	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
IBSBF 96h	1.665	Amp	12.511	15.267	13.641.912	2,43E+16	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
IBSBF 168h	1.579	Amp	7.668	15.267	32.736.067	5,83E+16	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
IBSBF 168h	1.577	Amp	8.757	15.267	95.414.667	1,70E+17	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
IBSBF 168h	1.495	No Amp	14.851	15.267	0,965216	1,72E+09	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
IBSBF 168h	1.552	Amp	7.541	15.267	3.782.506	6,74E+15	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077
IBSBF 168h	1.551	Amp	15.582	15.267	0,42167282	7,51E+08	916.265	148.195	0,8293	-20.345	0,077

CAPÍTULO III

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

Foram detectados 13 genes relacionados à ocorrência de VBNC como presentes nos genomas dos isolados CCRMTAQ13, CCRMTAQ18 e IBSBF2579 de *X. citri* pv. *anacardii*.

O gene *relA* foi eficiente como marcador para a quantificação de número de cópias/mL em qPCR na espécie *X. citri* pv. *anacardii*, evidenciando a ocorrência de células viáveis e não cultiváveis na espécie, mesmo quando ausente em cultivo in vitro. Isso nos mostra que a bactéria pode estar presente mesmo não sendo visível em algumas culturas, propagando mais rapidamente o fitopatógeno.

A viabilidade do inóculo, demonstrada pelos dados de incubação e severidade comprovaram a patogenicidade dos isolados de *X. citri* pv. *anacardii*, mesmo quando as células se encontram em fase de VBNC.

A confirmação da ocorrência de VBNC em *X. citri* pv. *anacardii* proporciona uma nova perspectiva de práticas de diagnose de doenças bacterianas do cajueiro, pois foi demonstrada a maior eficácia quando integradas práticas de diagnose convencionais e moleculares.