

MARCO AURÉLIO SIQUEIRA DA GAMA

**VARIABILIDADE DE ISOLADOS DE *Xanthomonas campestris* PV.
viticola, AGENTE DO CANCRO BACTERIANO DA VIDEIRA**

**RECIFE – PE
FEVEREIRO – 2014**

MARCO AURÉLIO SIQUEIRA DA GAMA

**VARIABILIDADE DE ISOLADOS DE *Xanthomonas campestris* PV. *viticola*,
AGENTE DO CANCRO BACTERIANO DA VIDEIRA**

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

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador(a): Elineide Barbosa de Souza

Co-orientador(a): Rosa de Lima Ramos Mariano

Co-orientador(a): Maria Angélica Guimarães Barbosa

RECIFE - PE

FEVEREIRO – 2014

**VARIABILIDADE DE ISOLADOS DE *Xanthomonas campestris* PV. *viticola*,
AGENTE DO CANCRO BACTERIANO DA VIDEIRA**

MARCO AURÉLIO SIQUEIRA DA GAMA

Tese _____ e _____ pela Banca Examinadora em: ____/____/____.

ORIENTADORA:

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

EXAMINADORES:

**RECIFE-PE
FEVEREIRO – 2014**

*Aos meus pais, **José Gama (In Memoriam)** e **Ana Gama**, aos meus irmãos **Frederico** e **Sarah Gama**, aos meus **tios** e **tias** e a minha querida avó **Edite Rodrigues (In Memoriam)**, pelo exemplo de vida, amor, carinho e compreensão.*

*A **Rosa Mariano**, minha referência pessoal e profissional, pela amizade, confiança e exemplo de vida.*

OFEREÇO

*A minha esposa, **Izabel Gama** e aos meus filhos, **Marco Vinícius** e **Rafael José**, os quais me inspiram e enchem minha vida de paz, amor e harmonia, pela paciência e compreensão dos momentos de ausência.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde, coragem e força que me são concedidos em todos os momentos;

À Professora Dra. Elineide Barbosa de Souza a minha estimada Professora Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano, pela atenção, confiança, dedicação, amizade e orientação pessoal, profissional e acadêmica, as quais foram extremamente valiosas para minha formação profissional e como ser humano;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia (PPGF) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pelos conhecimentos compartilhados e, à coordenação e aos funcionários do PPGF da UFRPE, pelo apoio prestado ao longo do curso;

À minha amada esposa Izabel, pelo companheirismo e dedicação;

A Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela concessão de bolsa de estudo;

Às queridas amigas Sayonara Paulino e Ana Rosa, por me conduzirem aos caminhos fitopatológicos e pela fraterna amizade e confiança;

Aos grandes amigos e parceiros do Laboratório de Fitobacteriologia da UFRPE, Adriano, Aldenir, Alexandre, Christtiano, Claudeana, Edilaine, Jéssica, Greecy, Kátia, Willams, Meridiana e Mirzânia, pelo companheirismo, apoio e colaboração na execução de atividades laboratoriais. Liliana, Mirtis e Ivanise, vocês foram parceiras inestimáveis;

A Luiz Coelho (Sr. Lula) e a Sr. Luiz, pelo apoio durante os trabalhos executados em casa de vegetação;

Aos grandes amigos José Mário, João Pessoa, Rodrigo Saldanha, Adrian Guerra, Renault de Lima, Henrique Hazin, Eric Teófanos e Sandro Guanais, pela amizade incondicional, apoio e companheirismo;•.

A todos que, diretamente e indiretamente, participaram desta caminhada, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO GERAL	viii
GENERAL ABSTRACT	ix
CAPÍTULO I	10
INTRODUÇÃO GERAL	11
1. A videira	11
2. Doenças da videira	13
3. O cancro bacteriano da videira	14
4. <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i>	18
5. Técnicas empregadas para caracterização polifásica de <i>Xanthomonas</i> spp.	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
CAPÍTULO II	39
CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DE <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> , AGENTE CAUSAL DO CANCRO BACTERIANO DA VIDEIRA.....	40
Resumo	40
Material e Métodos	44
Isolados bacterianos, condições de cultivo e testes de patogenicidade	44
Caracterização fenotípica	45
Caracterização molecular	48
Caracterização epidemiológica	50
Resultados	51
Testes de patogenicidade	51
Caracterização fenotípica	51
Caracterização molecular	53
Caracterização epidemiológica	54
Discussão	56
Agradecimentos	65
Literatura Citada	65

CAPÍTULO III	90
REPOSICIONAMENTO TAXONÔMICO DE ESPÉCIES DE <i>Xanthomonas</i> RELACIONADAS À VIDEIRA E AO CAJUEIRO	91
Resumo	91
Material e Métodos	95
Isolados bacterianos, condições de cultivo e extração de DNA	95
Caracterização metabólica	96
Caracterização epidemiológica	97
Caracterização molecular	98
Caracterização filogenética	99
Resultados	102
Caracterização metabólica	102
Caracterização epidemiológica	102
Caracterização molecular	103
Caracterização filogenética	104
Discussão	107
Agradecimentos	113
Literatura Citada	113
CONCLUSÕES GERAIS	139

RESUMO GERAL

O Nordeste é principal região produtora de uvas finas de mesa do Brasil, sendo responsável por mais de 99% das exportações nacionais deste produto. Dentre as doenças que ocorrem na videira, atenção especial deve ser dada ao cancro bacteriano, causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. Esta doença é uma das mais importantes na região Nordeste do Brasil, sendo responsável por danos severos e representando alto potencial de risco ao desenvolvimento da viticultura nacional. Por sua vez, isolados pigmentados de *X. axonopodis* relacionados às anacardiáceas foram detectados no Nordeste brasileiro causando lesões em frutos de cajueiros, os quais se tornam impróprios para a comercialização. *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e isolados pigmentados de *X. axonopodis* relacionados às anacardiáceas apresentam diversas semelhanças: origem indiana, ausência de xantomonadina (embora existam isolados variantes pigmentados de *X. axonopodis*), características epidemiológicas, sintomatológicas e genéticas, e reações cruzadas em testes sorológicos. O presente estudo teve como objetivos: I – caracterizar a variabilidade metabólica, molecular e epidemiológica de isolados brasileiros de *X. campestris* pv. *viticola* coletados nos diferentes estados onde a doença já ocorreu, desde a introdução da doença no Brasil até o ano de 2012 e II – analisar o relacionamento entre essas fitobactérias por meio de uma abordagem polifásica e utilizar a técnica de MLSA para analisar o relacionamento filogenético dessas fitobactérias com outras espécies de *Xanthomonas*. Os isolados de *X. campestris* pv. *viticola* formaram um grupo homogêneo composto por duas linhas evolucionárias, uma linha abrigando a maioria dos isolados (110) e a outra linha abrigando seis isolados. Foi observada elevada variabilidade intrapatovar para isolados de um mesmo táxon. Adicionalmente, 127 características metabólicas e os perfis moleculares e epidemiológicos foram apresentados. *X. campestris* pv. *viticola* posicionou-se no subgrupo 9.5 de *X. axonopodis*, apresentando-se estreitamente relacionada a *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* (rep-PCR e MLSA) e a *X. citri* subsp. *citri* (MLSA). Isolados pigmentados de *X. axonopodis* apresentaram-se estreitamente relacionados a *X. axonopodis* pv. *anacardii*, a qual já foi posicionada no subgrupo 9.6 de *X. axonopodis*. Os resultados obtidos neste estudo apoiam a proposta para reclassificação de *X. axonopodis* pv. *anacardii* e *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* como patovares de *X. citri*. As reclassificações de *X. campestris* pv. *viticola* como *X. citri* pv. *viticola* comb. nov. e dos isolados pigmentados de *X. axonopodis* como *X. axonopodis* pv. *anacardii* var. nov. *pigmentatus* são sugeridas.

GENERAL ABSTRACT

In Brazil the Northeast region is the main producer of fine table grapes, accounting for over 99% of national exports of this product. Among the diseases that occur on the grapevine, special attention should be given to bacterial canker, caused by *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. This disease is one of the most important in the Northeast region of Brazil, responsible for severe damage and representing high potential risk for the development of Brazilian viticulture. Likewise, the pigmented isolates of *X. axonopodis* related to Anacardiaceae were detected in the Brazilian Northeast, causing lesions on fruits of cashew trees, which become unfit for marketing. *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* and pigmented strains of *X. axonopodis* related to Anacardiaceae have several similarities: Indian origin, no xantomonadina (although there are pigmented isolates of *X. axonopodis*), epidemiologic, symptomatic and genetic characteristics, and cross-reactivity in serological tests. The present study aimed to: I - to characterize the metabolic, molecular and epidemiological variability of Brazilian strains of *X. campestris* pv. *viticola* collected in states where the disease has occurred since the introduction of the disease in Brazil until the year 2012 and II – to analyze the relationship between these plant pathogenic bacteria through a polyphasic approach and use the MLSA technique to analyze the phylogenetic relationship of these bacteria with other *Xanthomonas* species. Isolates of *X. campestris* pv. *viticola* formed a homogeneous group composed of two evolutionary lines, one line harboring the majority of isolates (110) and another line harboring six isolates. High variability intrapatovar for isolates of the same taxon was observed. Additionally, 127 metabolic characteristics and molecular and epidemiological profiles were presented. *X. campestris* pv. *viticola* positioned in the subgroup 9.5 of *X. axonopodis*, closely related to *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* (rep-PCR and MLSA) and *X. citri* subsp. *citri* (MLSA). Pigmented strains of *X. axonopodis* were closely related to *X. axonopodis* pv. *anacardii*, which has been positioned in the subgroup 9.6 of *X. axonopodis*. The results of this study support the proposal for reclassification of *X. axonopodis* pv. *anacardii* and *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* as pathovars of *X. citri*. The reclassification of *X. campestris* pv. *viticola* as *X. citri* pv. *viticola* comb. nov. and the pigmented isolates of *X. axonopodis* as *X. axonopodis* pv. *anacardii* var. nov. *pigmentatus* are suggested.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

1. A Videira

No Brasil, a videira (*Vitis L. spp.*) é cultivada desde o extremo Sul, principalmente no Rio Grande do Sul e Santa Catarina, até o Nordeste (POMMER, 2003). No semiárido nordestino, a viticultura se destaca no cenário nacional pela expansão da área cultivada, volume de produção e, sobretudo, pelos altos rendimentos alcançados e qualidade do produto (LEÃO; SOARES, 2000).

A viticultura está presente no Nordeste brasileiro desde o século XVI, nos municípios de Petrolina (PE) e Juazeiro (BA) (Vale do Submédio São Francisco) (LEÃO; SOARES, 2000). No entanto, o cultivo da videira intensificou-se nesta região a partir de 1950, com um aumento expressivo de produção a partir de 1990 (LIMA; MOREIRA, 2002). Devido ao emprego da irrigação, o Vale do Submédio São Francisco bem como extensas áreas de Minas Gerais, as quais eram consideradas climaticamente inaptas, se tornaram excelentes produtoras de uva (POMMER, 2003).

A videira pode ser cultivada para diferentes finalidades, sendo classificada comercialmente em uvas para mesa (consumo *in natura*), para vinificação, para passas e para sucos doces (LEÃO; SOARES, 2000). No Brasil, a região Sul é a maior produtora de uva, com produção destinada, principalmente, à fabricação de vinho e sucos, enquanto nas regiões Sudeste e Nordeste predomina a produção de uvas de mesa (LEÃO, 2004). A região Nordeste, mais precisamente o polo Agroindustrial de Petrolina-Juazeiro, abriga os maiores produtores de uva de mesa do país (ARAUJO, 2001), embora o mercado de uvas para vinhos também esteja em expansão, com o surgimento de diversas vinícolas (MELLO, 2006).

Em 2012, a região Nordeste produziu aproximadamente 290.000 toneladas de uvas, com o valor da produção em torno de 680 milhões de reais, o que representou cerca de 38% do total produzido no Brasil. Juntos, os estados da Bahia e de Pernambuco se sobressaíram pela produção de aproximadamente 99% das uvas do Nordeste (IBGE, 2013). A cultura da videira destaca-se ainda pela grande importância sócio-econômica para essa região, gerando milhares de empregos diretos e indiretos e caracterizando-se como uma das culturas que mais absorve mão-de-obra (ARAUJO, 2001).

A maior parte da produção de uva oriunda do Vale do Submédio São Francisco tem sido comercializada no mercado interno regional e nacional (LEÃO; SOARES, 2000). No

mercado internacional, essa região se destaca como produtora de uvas de mesa finas (LEÃO, 2004), sendo responsável por 99% das exportações nacionais (LAZZAROTTO; FIORAVANÇO, 2013), as quais alcançaram aproximadamente 59.400 toneladas de uvas em 2011, o que correspondeu a divisas em torno de 136 milhões de dólares (FAO, 2014). Contudo, é importante salientar que o Brasil ainda apresenta uma participação bastante discreta no comércio exterior de uva de mesa, contribuindo apenas com cerca de 1,4% das exportações mundiais da fruta (LAZZAROTTO; FIORAVANÇO, 2013). Os países principais exportadores de uva são Chile, Itália, Estados Unidos, Holanda, África do Sul, Turquia e China, os quais foram responsáveis por mais de 69% das exportações mundiais da fruta em 2011 (FAO, 2014).

A videira pertence à ordem *Rhamnales*, família *Vitaceae* e gênero *Vitis*, o qual é o único com importância econômica e alimentar, sendo composto pelas seções *Muscadinia*, com 40 cromossomos ($n=20$) e *Euvitis*, com 38 cromossomos ($n=19$) (LEÃO; SOARES, 2000). O provável centro de origem da videira foi a Groelândia, onde os fósseis mais antigos de suas ancestrais foram encontrados. No entanto, o cultivo e domesticação da cultura parecem ter ocorrido entre o sétimo e quarto milênio A.C., em áreas geográficas entre o mar Negro e o Irã. A partir dessas áreas, formas cultivadas foram distribuídas para o Oriente Próximo, Oriente Médio e Europa Central (TERRAL et al., 2010). Atualmente, a videira pode ser classificada em dois tipos: europeia (*Vitis vinifera* L.) do centro da Ásia Central, oriunda de regiões que possuem o clima típico mediterrâneo e, americana (*Vitis labrusca* L. e outras espécies) oriunda do continente norte americano (POMMER, 2003).

Existem milhares de variedades de videiras, as quais são adaptadas a vários tipos de solo e clima, o que possibilita o cultivo em quase todas as regiões do mundo. No entanto, as uvas são bastante sensíveis e variam de acordo com as condições edafoclimáticas em que se desenvolvem, apresentando características físicas e organolépticas diferenciadas (POMMER, 2003).

No Brasil, são cultivados dois grupos de uvas de mesa: uvas finas, em sua maioria variedades da espécie *V. vinifera*, as quais apresentam bagas grandes e polpa carnosa, a exemplo das cultivares Itália e Red Globe; e uvas comuns, que na sua maioria são variedades ou híbridas da espécie *V. labrusca*, as quais apresentam bagas médias a grandes e polpa mucilaginosas, como por exemplo, as cultivares Isabel e Niagara (TRINDADE, 2007). As uvas finas são variedades mais suscetíveis a doenças e altamente exigentes em tratamentos culturais, enquanto as uvas comuns são utilizadas tanto para o processamento quanto para o consumo *in*

natura, sendo mais tolerantes a doenças e mais adaptadas ao clima frio (LEÃO; SOARES, 2000).

A videira apresenta uma sucessão de ciclos vegetativos, intercalados por períodos de repouso. Em regiões de clima bem definido, essas fases acompanham as variações estacionais, com brotações ocorrendo na primavera e queda das folhas no outono. As melhores condições para o crescimento e desenvolvimento da videira se encontram em regiões com verões longos e secos, moderadamente quentes, e com invernos frios para satisfazer as necessidades de repouso vegetativo (POMMER, 2003).

Em condições semiáridas, o repouso vegetativo é dado pela época seca. O manejo da irrigação aliado ao clima quente acelera os processos fisiológicos das plantas e o ciclo de produção oscila em torno de 120 dias, podendo-se obter até duas safras e meia por ano, o que possibilita a produção durante todo o ano e uma produtividade elevada (LEÃO, 2004; POMMER, 2003). Além disso, tais condições climáticas também permitem a colheita dos frutos nos períodos de preços mais elevados, o que torna a viticultura uma atividade que apresenta menor grau de incerteza e elevada rentabilidade econômica (LEÃO, 2004).

2. Doenças da videira

A expansão da viticultura se deve à evolução tecnológica em viticultura tropical, fazendo com que a produção de uvas de mesa ocorra durante todo o ano, garantindo além do estabelecimento interno, a exportação em períodos de escassez no mercado internacional (POMMER, 2003). No entanto, a rápida expansão da viticultura no Nordeste do Brasil, o plantio de cultivares suscetíveis e as condições climáticas prevalentes no Vale do Submédio São Francisco propiciaram o surgimento de diversas doenças até então desconhecidas ou consideradas sem importância econômica para a cultura, afetando diretamente a cadeia produtiva nesta região (TAVARES, 1995; FREIRE; OLIVEIRA, 2001).

A videira pode ser afetada por fungos, vírus, nematoides e bactérias. No Brasil, as principais doenças da videira causadas por fungos são: míldio (*Plasmopara viticola* Berl e Toni), oídio (*Uncinula necator* (Shw.) Burril), mofo cinzento (*Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel), antracnose (*Elsinoe ampelina* (de Bary) Shear), podridão seca ou morte descendente (*Botryodiplodia theobromae* Pat.), fusariose (*Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *herbemontis* Tocchetto) e ferrugem (*Phakopsora euvitis* Ono) (AMORIM; KUNYUKI, 2005). Dentre as fitoviroses relatadas no Brasil destacam-se: enrolamento da folha (*Grapevine*

leafroll-associated virus), mosaico das nervuras (*Grapevine flek virus*), complexo do lenho rugoso (*Grapevine virus A* e *Grapevine virus B*) e canelura do tronco da videira (*Grapevine stem pitting disease*) (AMORIM; KUNYUKI, 2005). Quanto às fitonematoses, sobressaem-se as galhas formadas em raízes por espécies do gênero *Meloidogyne* Göeldi spp. (KUHN; FARJADO, 2003). Por sua vez, as fitobacterioses de ocorrência no Brasil são: galha em coroa (*Rhizobium vitis* Ophel e Kerr) (OLIVEIRA; ROMEIRO; LACERDA, 1994) e cancro bacteriano (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye) (MALAVOLTA et al., 1999).

Dentre as doenças acima relacionadas, atenção especial deve ser dada ao cancro bacteriano, visto que os danos causados por essa enfermidade no Vale do Submédio São Francisco são significativos, sendo um dos maiores problemas fitossanitários da videira nesta região (TRINDADE, 2007). Este fato levou a bactéria a ser considerada como praga quarentenária presente (A2) nos estados da Bahia, Pernambuco e Piauí (INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 38/1999). Dessa forma, *X. campestris* pv. *viticola* passou a ser considerada como uma praga de importância econômica potencial, com programa oficial de controle estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

3. O cancro bacteriano da videira

A ocorrência do cancro bacteriano da videira foi observada pela primeira vez em 1969 na Índia, quando Nayudu (1972) verificou a presença dos sintomas característicos da doença em videiras da cultivar Anab-e-Shahi em parreirais do Colégio Agrícola de Tirupati. No Brasil, a doença foi detectada pela primeira vez em 1998, em parreirais do Vale do Submédio São Francisco (cv. Red Globe), mais precisamente no estado de Pernambuco (LIMA et al., 1999; MALAVOLTA JR et al., 1999), onde foi inadvertidamente introduzida por produtores a partir de bacelos contaminados oriundos da Índia (FREIRE; OLIVEIRA, 2001; RODRIGUES NETO et al., 2011). Ainda no ano de 1998, o cancro bacteriano foi relatado nos estados da Bahia e Piauí (LIMA et al., 1999), sendo, posteriormente, observado nos estados do Ceará (FREIRE; OLIVEIRA, 2001), Goiás (JUNQUEIRA et al., 2006), Minas Gerais (JUNQUEIRA et al., 2006; MARQUES, 2007), Paraná (TOMAZ et al., 2011), Roraima (HALFELD-VIEIRA; NECHET, 2006) e São Paulo (RODRIGUES NETO et al., 2011). No entanto, a doença foi erradicada da maioria desses estados, estando presente atualmente apenas nos estados da Bahia, Ceará e Pernambuco (Instrução Normativa N° 59/2007).

A ocorrência mundial do cancro bacteriano da videira é muito restrita (TRINDADE; LIMA; FERREIRA, 2005), sendo limitada aparentemente ao Brasil (LIMA et al., 1999; MALAVOLTA JR et al., 1999), Índia (NAYUDU, 1972), Tailândia (BUENSANTEAI, 2004) e Ucrânia (KOCHENKO, 1993 citado por TRINDADE; LIMA; FERREIRA, 2005). No Brasil, esta doença caracteriza-se como uma das mais importantes enfermidades na região do Vale do Submédio São Francisco, sendo responsável por danos severos e representando sério potencial de risco ao desenvolvimento da viticultura nacional (ARAUJO et al., 2005). Em levantamentos realizados em 2004 verificou-se que de 18 propriedades visitadas, 17 apresentaram videiras com sintomas do cancro bacteriano, ou seja, prevalência de 94,4%. Nestas propriedades, a incidência variou de 10 a 100% e de 92 a 100% em parcelas com as cultivares Sugaone e Red Globe, respectivamente (LOPES; NASCIMENTO, 2004). Na Índia, alguns registros demonstram que parreirais infectados podem sofrer perdas que variam entre 60% e 80% da produção (CHAND; KISHUN, 1990). Na Tailândia, o cancro bacteriano da videira encontra-se amplamente distribuído (BUENSANTEAI, 2004). No entanto, não existem informações disponíveis sobre o impacto da doença neste país. A ocorrência de uma fitobactéria causadora de cancos em videiras também foi registrada na Ucrânia, embora sem deixar evidente o agente causal da doença (KOCHENKO, 1993 citado por TRINDADE; LIMA; FERREIRA, 2005). Entretanto, não existem registros na literatura a respeito do comportamento da doença neste país.

Os sintomas característicos do cancro bacteriano apresentam-se como manchas de coloração escura, alongadas e irregulares, principalmente nos ramos, podendo se localizar também nos pecíolos e engaços. Com a evolução da infecção as lesões se transformam em cancos, podendo atingir até 5 cm nos ramos, se aprofundando nos tecidos e provocando colapso no transporte da seiva (FREIRE; OLIVEIRA, 2001). Nas folhas, observam-se pequenas lesões escuras e angulares, com ou sem halos amarelos, as quais ao coalescerem necrosam grandes áreas do limbo foliar. As nervuras apresentam-se necrosadas, sobretudo na face abaxial do limbo foliar (FREIRE; OLIVEIRA, 2001; MALAVOLTA JR. et al., 1999; NAYUDU, 1972), sendo este um sintoma muito importante para a confirmação da doença, quando as lesões foliares não são características e na ausência de cancos distintos na planta. As bagas são desuniformes em tamanho e cor, podendo apresentar lesões necróticas (NASCIMENTO, 2005).

Xanthomonas campestris pv. *viticola* pode ser introduzida em parreirais sadios por meio de mudas ou bacelos infectados, os quais irão originar plantas doentes (NASCIMENTO, 2005). A disseminação da bactéria pode ocorrer através de restos culturais infectados

espalhados pelo pomar, aderidos em roupas, veículos e instrumentos agrícolas não desinfestados (NASCIMENTO; MARIANO, 2004) e por meio dos cancrios formados em plantas doentes, os quais se caracterizam como importantes fontes de inóculo para disseminação da bactéria por meio de respingos de água (CHAND; PATIL; KISHUM, 1991; NAYUDU, 1972).

A penetração da bactéria ocorre tanto por meio de ferimentos, principalmente aqueles causados por tratos culturais, ventos fortes (NASCIMENTO; MARIANO, 2004) e danos nos tricomas, quanto por meio de aberturas naturais, como os estômatos (ARAUJO, 2001). Após a penetração, a bactéria multiplica-se rapidamente, colonizando os espaços intercelulares, invadindo o sistema vascular e, conseqüentemente, causando infecções sistêmicas (ARAUJO, 2001; NASCIMENTO; MARIANO, 2004).

Temperaturas de 25 a 30°C em conjunto com a alta umidade relativa do ar proporcionam condições favoráveis ao desenvolvimento da doença em campo (CHAND; PATIL; KISHUM, 1991). A bactéria sobrevive de um ciclo para o outro nos cancrios de plantas infectadas ou epifiticamente na parte aérea de plantas assintomáticas (ARAUJO, 2001; ARAUJO et al., 2005). No solo, a sobrevivência de *X. campestris* pv. *viticola* pode durar até 80 dias em restos culturais, sendo reduzida a 10 dias quando estes são incorporados em sistemas de compostagem (SILVA et al., 2012).

Quando inoculada artificialmente, *X. campestris* pv. *viticola* é capaz de causar infecção em plantas de mangueira (*Mangifera indica* L.), cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda), cajá-manga (*Spondias dulcis* Forst.), aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi) (ARAUJO 2001), nim (*Azadirachta indica* Juss) (MALAVOLTA; ALMEIDA, 2000), alecrim (*Alternanthera tenella* Colla), bredo (*Amaranthus* sp. L.), soja perene (*Glycine* sp. L.), fedegoso (*Senna obtusifolia* (L.) Irwin e Barneby), brilhantina (*Pilea* sp. L.), burra-leiteira (*Chamaesyce hirta* (L.) Millsp.), capim barbicha-de-leão (*Eragrostis pilosa* Beauv.) e capim mão-de-sapo (*Dactyloctenium aegyptium* (L.) Beauv.) (PEIXOTO et al., 2007), demonstrando que estas plantas possivelmente podem servir como hospedeiros alternativos para a bactéria, em campo.

Diversas variedades ou híbridos de videira apresentam diferentes graus de resistência ao cancro bacteriano. Chand (1992) testou 14 espécies de *Vitis*, sete outras vitáceas e 73 cultivares de *V. vinifera* e verificou que, entre as espécies de *Vitis* analisadas, *V. vinifera* foi altamente suscetível, *Vitis labrusca* se mostrou resistente (em condições de campo) ou moderadamente resistente (por meio de inoculação artificial), *V. rupestris* e *V. berlandieri* foram resistentes e *V. riparia* altamente resistente. Nascimento et al. (2006) avaliaram a

reação de videiras ao cancro bacteriano e verificaram que o clone Brasil (*V. vinifera*) apresentou a maior intensidade de doença, enquanto os clones de Isabel (*V. labrusca*) e Paulsen 1103 (*Vitis berlandieri* Planchon x *Vitis rupestris* Scheele x *Vitis riparia* Michaux) apresentaram as menores intensidades.

Malavolta Jr. et al. (2003) ao avaliarem as reações de variedades de videira pertencentes às espécies *V. vinifera* e *V. labrusca* x *V. vinifera* ao cancro bacteriano verificaram que híbridos de *V. labrusca* x *V. vinifera* (Niagara Branca e Niagara Rosada) apresentaram baixos índices de severidade de doença, enquanto variedades de *V. vinifera* (Red Globe, Benitaka, Rubi, Itália) apresentaram altos índices. Os baixos níveis de severidade da doença observados nos híbridos de *V. labrusca* x *V. vinifera* indicaram que a resistência é oriunda de *V. labrusca*, cujo genótipo deve conter os genes para esta característica (NASCIMENTO et al., 2006). No entanto, de acordo com Malavolta Jr. et al. (2003), embora as variedades de *V. vinifera* tenham se mostrado mais suscetíveis, o fato do patógeno também poder infectar os híbridos de *V. labrusca* x *V. vinifera* demonstra a importância dos cuidados com relação ao trânsito de material vegetal e introdução de mudas em estados brasileiros livres da bactéria.

De acordo com a Instrução Normativa nº 9, anexo 3, de 20 de abril de 2006, o manejo do cancro bacteriano da videira deve ser realizado adotando-se medidas de: I) prevenção, por meio da desinfestação de veículos, máquinas, implementos, equipamentos e material de colheita, II) controle, por meio destruição de material contaminado; controle químico com produtos recomendados pela pesquisa; e eliminação de hospedeiras alternativas da bactéria, comprovadas pela pesquisa, e III) de erradicação, por meio da eliminação de plantas com sintomas e das circunvizinhas, incluindo as raízes.

No anexo I da Instrução Normativa citada acima, consta que a variedade Red Globe possui alto grau de suscetibilidade, as variedades Thompson, Benitaka, Festival (Superior), Sonaka, Itália e Rubi possuem médio grau, enquanto as variedades Niagara Rosada, Niagara Branca e Princês possuem baixo grau de suscetibilidade.

Desde o aparecimento do cancro bacteriano no Vale do Submédio São Francisco, a área plantada com a cultivar Red Globe, uma das principais cultivares de uva de mesa, diminuiu sensivelmente, pois devido à alta susceptibilidade, muitos produtores da região optaram por erradicá-la (MARQUES, 2007). Além disso, nas áreas remanescentes a produção é concentrada em apenas um ciclo, no segundo semestre, quando a ausência ou ocorrência esparsa de chuvas desfavorece a doença (SILVA, 2009).

4. *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*

Xanthomonas campestris pv. *viticola* foi inicialmente classificada por Nayudu, em 1972, como *Pseudomonas viticola* Nayudu sp. nov. Em 1978, Young et al. propuseram alterações no sistema de classificação de bactérias fitopatogênicas e oficializaram o uso do termo patovar, o qual foi designado para classificação infrasubespecífica provisória de fitobactérias até que uma nova classificação pudesse ser realizada com base em critérios mais sólidos. Nesta ocasião, mais de 100 fitobactérias foram reclassificadas como patovares de *X. campestris* (Pammel) Dowson com base em características fenotípicas e na gama de hospedeiros. Dessa forma, *P. viticola* foi reclassificada como *X. campestris* pv. *viticola* (YOUNG et al., 1978).

Ao longo dos anos, a maioria dos patovares de *X. campestris* inicialmente descritos por Young et al. (1978) foram reclassificados. No entanto, é importante mencionar que nenhum estudo conclusivo de reclassificação foi realizado com *X. campestris* pv. *viticola*.

Quando Vauterin et al. (1995) realizaram o primeiro grande estudo de hibridização DNA-DNA dentro do gênero *Xanthomonas* Dowson, *X. campestris* passou a ser designada para abrigar apenas isolados patogênicos a brassicáceas. Segundo os autores, o patovar *viticola*, bem como outros 65 patovares formalmente descritos por Young et al. (1978), deveriam ser cuidadosamente analisados por meio de abordagens polifásicas e alocados para outras espécies ou elevados ao nível de espécie. No entanto, para preservar a designação desses patovares até que tais estudos fossem conduzidos, Vauterin et al. (1995) propuseram classificá-los temporariamente como *Xanthomonas* sp. seguindo-se o epíteto apropriado do patovar. Dessa forma, *X. campestris* pv. *viticola* passaria a ser designada como *X. sp. viticola*. No entanto, essa nomenclatura não tem sido utilizada em periódicos indexados, nem tão pouco pela legislação brasileira. Além disso, o Comitê sobre a Taxonomia de Fitobactérias da Sociedade Internacional de Fitopatologistas (Committee on the Taxonomy of Plant Pathogenic Bacteria - International Society of Plant Pathology) recomenda o uso do epíteto *X. campestris* pv. *viticola* (BULL et al., 2010), razão pela qual o mesmo é utilizado no presente estudo.

Embora sejam inconclusivos, outros estudos também indicam claramente a necessidade de reclassificar o agente etiológico do cancro bacteriano da videira. Na análise da região *rpf* e de outras regiões (não especificadas) em diferentes espécies e patovares de *Xanthomonas*, foi verificado que *X. campestris* pv. *viticola* apresentou maior similaridade com *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (ex Hasse) Gabriel et al. (sinonímias: *Xanthomonas*

axonopodis pv. *citri* (Hasse) Vauterin et al.; *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye) (TAKITA et al., 2004).

Marques (2007) verificou a existência de alta homologia entre sequências amplificadas a partir do DNA de isolados de *X. campestris* pv. *viticola* e o gene *copA*, o qual encontra-se presente em diversas espécies e patovares do gênero *Xanthomonas* e está envolvido no processo de resistência ao cobre. A árvore filogenética gerada pelo método Neighbor-Joining mostrou maior distância entre *X. campestris* pv. *viticola* e *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (ex Ishiyama) Swings et al. e também *X. campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson, bem como maior proximidade com *X. citri* subsp. *citri*. Estes resultados confirmaram as observações de Takita et al. (2004) e indicaram um relacionamento mais próximo de *X. campestris* pv. *viticola* com *X. citri* subsp. *citri* do que com *X. campestris* pv. *campestris* (MARQUES, 2007).

Recentemente, análises de comparações de sequências genômicas de *X. campestris* pv. *viticola* com genomas completos de *X. citri* subsp. *citri*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. campestris* pv. *campestris* e *X. oryzae* pv. *oryzae* demonstraram valores de identidade média de aproximadamente 95, 89, 65 e 72%, respectivamente, indicando mais uma vez maior proximidade de *X. campestris* pv. *viticola* com *X. citri* subsp. *citri* (TAKITA et al., 2006). No entanto, análises de sequências multilocus (multilocus sequence analysis - MLSA) e hibridização DNA-DNA (FERREIRA-TONIN, 2012; FERREIRA-TONIN et al., 2011) indicaram que *X. campestris* pv. *viticola* na verdade pertence à espécie *X. axonopodis* Starr e Garces. Portanto, ainda é necessário que estudos mais aprofundados sejam realizados para determinar o relacionamento entre *X. campestris* pv. *viticola* e *X. citri* subsp. *citri*.

Isolados de *X. campestris* pv. *viticola* e de *X. axonopodis* patogênicos a hospedeiros da família Anacardiaceae apresentam diversas semelhanças: ambos foram relatados pela primeira vez na Índia, não produzem xantomonadina (embora existam ocorrências de isolados pigmentados na África do Sul, Brasil, Flórida e Ilhas Reunião) e apresentam características epidemiológicas em comum. Além disso, essas fitobactérias apresentam reações cruzadas em testes sorológicos (ARAUJO et al., 2005) e elevada similaridade genética revelada por meio de rep-PCR (TRINDADE et al., 2005), indicando que existe um estreito relacionamento entre elas. Portanto, o estudo do relacionamento filogenético entre essas fitobactérias pode contribuir tanto para o esclarecimento das reações cruzadas observadas em testes diagnósticos quanto para o melhor entendimento da biologia e posicionamento taxonômico desses fitopatógenos (TRINDADE, 2005).

Isolados de *X. axonopodis* patogênicos às anacardiáceas foram inicialmente classificados como *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (Patel et al.) Robbs et al. (YOUNG et al., 1978), sendo posteriormente reclassificados como *X. axonopodis* pv. *anacardii* Ah-You et al. (mancha angular do cajueiro), *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* (Patel et al.) Ah-You et al. (mancha angular da mangueira) e *X. axonopodis* pv. *spondiae* Ah-You et al. (mancha angular do cajá-manga) (AH-YOU et al., 2007). Em seguida, essas fitobactérias foram novamente reclassificadas como patovares de *X. citri*: *X. citri* pv. *anacardii* Ah-You et al. e *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* (Patel et al.) Ah-You et al. (AH-YOU et al., 2009). No entanto, esses epítetos não foram devidamente validados pelo fato de não estarem de acordo com as normas 17 e 21 do padrão internacional para classificação de patovares de fitobactérias (International Standards for Naming Pathovars of Plant Pathogenic Bacteria), as quais determinam que novas combinações sejam acompanhadas por descrições formais e designadas como pv. nov. ou comb. nov., respectivamente (BULL et al., 2012). Portanto, a classificação de isolados de *X. axonopodis* patogênicos a hospedeiros da família Anacardiaceae é provisória e não reflete os respectivos status taxonômicos. Além disso, tais isolados são, na verdade, patovares de *X. citri*, indicando que *X. campestris* pv. *viticola* pode realmente estar mais próxima à *X. citri*, conforme sugerem os trabalhos de Marques (2007), Takita et al. (2004), Takita et al. (2006) e Trindade et al. (2005), e indicando mais uma vez a necessidade de investigar esse relacionamento.

Quanto às características morfológicas, culturais, bioquímicas e fisiológicas, *X. campestris* pv. *viticola* caracteriza-se por apresentar células em formato de bastonete, Gram-negativas e com um único flagelo polar (ARAUJO, 2001; NAYUDU, 1972). Apresenta colônias arredondadas, brilhantes, com bordos lisos e coloração esbranquiçada em meio ágar-nutritivo devido à ausência de xantomadina (ARAUJO, 2001). Não utiliza o nitrato como fonte de nitrogênio e a asparagina não é utilizada como fonte de carbono e nitrogênio. Cresce bem em sais de amônio e ácido glutâmico, embora tenha melhor crescimento em caseína hidrolisada (NAYUDU, 1972). A produção de ácidos ocorre a partir de D(-) arabinose, D-frutose, D(+) galactose, D-glicose, D(-) manitol, manose, melibiose, sacarose, D(+) trealose, mas não a partir de D(+) celobiose, dulcitol, glicerol, m-inositol, lactose, D(+) maltose, rafinose, rhamnose, D-salicina e D(-) sorbitol (MALAVOLTA et al., 1999). Apresenta reação de hipersensibilidade negativa em folhas de fumo (LIMA et al., 1999; MALAVOLTA et al., 1999) e positiva em folhas de tomateiro (MALAVOLTA et al., 1999). Em meio de cultura líquido, *X. campestris* pv. *viticola* apresenta crescimento ótimo em temperaturas de 27 a 29°C,

pH ótimo de 7,5 e decréscimo de crescimento a partir de 3% de NaCl, chegando a zero na concentração de 6% (NASCIMENTO; MARIANO; GAMA, 2005).

A detecção e identificação de isolados de *X. campestris* pv. *viticola* pode ser realizada por meio de testes sorológicos e moleculares. Araujo et al. (2005) produziram dois anticorpos policlonais (AC 4558 e AC 4560) com limite de detecção até 10^4 UFC ml⁻¹, os quais podem ser utilizados por meio do teste ELISA direto. Segundo os autores, embora esses anticorpos apresentem reações cruzadas com isolados de *Xanthomonas vesicatoria* (ex Doidge) Vauterin et al., *X. campestris* pv. *campestris* e isolados de *X. axonopodis* associados à anacardiáceas, tais reações são de pouca importância prática, uma vez que essas fitobactérias possuem hospedeiros específicos, não infectando videiras.

Isolados de *X. campestris* pv. *viticola* podem ser detectados e identificados por meio de PCR com os primers Xcv1F/Xcv3R e RST2/Xcv3R, os quais amplificam fragmentos de 243 e 340 pb do gene *hrpB*, respectivamente. Interessantemente, esses primers também amplificam esses fragmentos a partir do DNA de isolados de *Xanthomonas* associados a anacardiáceas e de isolados de *X. campestris* pv. *passiflorae* (Pereira) Dye, sendo considerados semiespecíficos. No entanto, a análise de RFLP dos produtos de amplificação dos primers RST2/Xcv3R com *Hae*III geram padrões de restrição distintos para as três fitobactérias, demonstrando a utilidade desta técnica para o monitoramento de *X. campestris* pv. *viticola* em videiras (TRINDADE et al., 2007).

Análises realizadas por meio de rep-PCR indicaram a existência de variabilidade genética entre isolados de *X. campestris* pv. *viticola* coletados nos estados da Bahia, Pernambuco, Piauí e Minas Gerais (TRINDADE; LIMA; FERREIRA, 2005; MARQUES et al., 2007). Trindade, Lima e Ferreira (2005) reportaram a formação de cinco subgrupos ao nível de 68% de similaridade entre 40 isolados oriundos de diferentes municípios dos estados de Pernambuco, Bahia e Piauí coletados entre 1998 e 2001. Em outro estudo, Marques (2007) verificou a formação de cinco subgrupos a 70% de similaridade entre 32 isolados coletados nos anos de 1998 a 2006 nos estados da Bahia, Pernambuco e Minas Gerais. Em ambos os trabalhos, nenhuma correlação foi observada entre os isolados estudados e a cultivar de origem, local ou época de coleta. A existência da variabilidade intrapatovar de *X. campestris* pv. *viticola* deve ser levada em consideração na adoção de medidas de controle baseadas na seleção de material resistente (TRINDADE; LIMA; FERREIRA, 2005).

5. Técnicas empregadas para caracterização polifásica de *Xanthomonas* spp.

O sistema de classificação convencional (análise de características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas) criou dúvidas e muita confusão a respeito do real status taxonômico de muitos fitopatógenos (PRAKASH et al., 2007). Para evitar esses problemas, atualmente a classificação de microrganismos utiliza vários métodos que possibilitam a completa resolução dos táxons (PRAKASH et al., 2007), o que vem sendo chamado de caracterização polifásica. Esta caracterização, também conhecida como taxonomia polifásica, integra diferentes tipos de dados e informações (genotípica, fenotípica e fisiológica) sobre o táxon, constituindo-se essencialmente um sistema taxonômico consensual (VANDAMME et al., 1996), o qual pode ser utilizado para o delineamento de táxons em todos os níveis (MURRAY et al., 1990).

Embora as principais características morfológicas, culturais, bioquímicas e fisiológicas de *X. campestris* pv. *viticola* sejam bem conhecidas, existe pouca informação sobre o perfil metabólico desta fitobactéria. A caracterização da variabilidade metabólica de isolados bacterianos pode permitir que determinadas características sejam utilizadas como marcadores metabólicos, úteis para diferenciação e classificação de isolados (VERNIERE et al., 1993). Diferentes bactérias e até mesmo isolados de uma mesma espécie bacteriana apresentam reações enzimáticas, requerimentos específicos para o crescimento e utilização de substratos distintos. Portanto, a caracterização desse perfil metabólico pode oferecer uma resolução adequada ao ponto de permitir a identificação de gêneros e espécies bacterianas. No entanto, diversos testes devem ser realizados para esta finalidade, os quais são trabalhosos, demandam tempo e não são padronizados entre os laboratórios (MAREFAT, 2005). Para superar essas dificuldades, sistemas comerciais foram desenvolvidos para caracterização metabólica de bactérias por meio da avaliação da utilização diferencial de fontes de carbono/sensibilidade a substâncias ou condições inibitórias, e posterior comparação do perfil gerado com informações armazenadas em bancos de dados (VERNIERE et al., 1993; BIOLOG, 2010).

Dentre os sistemas mais comumente utilizados para caracterização metabólica de bactérias destacam-se aqueles desenvolvidos pela Biolog Inc. (Hayward, Califórnia). Esses sistemas tem sido empregados para gerar perfis metabólicos e demonstrar a variabilidade existente entre isolados de *Xanthomonas* spp., bem como para identificação de diversas fitobactérias (MAREFAT, 2005). No entanto, é importante mencionar que tais sistemas raramente permitem uma identificação acurada em níveis infraespecíficos (SCHAAD; JONES; CHUN, 2001). Além disso, a identificação de bactérias apenas por meio desta técnica

apresenta baixa confiabilidade, sendo necessário que outros métodos sejam utilizados (VERNIERE et al., 1993).

Um dos grandes problemas na utilização do controle químico é a ocorrência na natureza de isolados bacterianos resistentes, mesmo se nunca expostos anteriormente a antibióticos, bem como a seleção de populações resistentes devido ao uso continuado desses produtos (LOPES; QUEZADO-SOARES, 1997). Desta forma, quando vários isolados de uma mesma bactéria fitopatogênica são testados quanto à sensibilidade a um conjunto fixo de antibióticos, há tendência de se traçar um perfil característico da espécie (ROMEIRO et al., 1993). A ocorrência de isolados de *X. campestris* pv. *viticola* resistentes a antibióticos e cúpricos tem sido relatada em diversas pesquisas. Peixoto, Mariano e Viana (2006) testaram a sensibilidade a antibióticos de 12 isolados do patógeno e verificaram resistência a optoquina, clindamicina, trimetropim, cefaclor, oxacilina, amoxicilina, nitrofurantoína e ampicilina. Em outro estudo, diferentes isolados de *X. campestris* pv. *viticola* apresentaram variabilidade quanto à tolerância a íons de cobre, sugerindo a ocorrência natural de tolerância nas regiões produtoras, onde o uso de compostos cúpricos é bastante frequente (ARAUJO, 2001). A variabilidade quanto à sensibilidade ao oxiclreto de cobre e ao sulfato de cobre entre 18 isolados de *X. campestris* pv. *viticola* coletados no Vale do Submédio São Francisco, indicou uma tendência para aumento da tolerância ao cobre entre os isolados brasileiros dessa bactéria ao longo do anos (MARQUES; UESUGI; FERREIRA, 2009).

No desenvolvimento de estratégias de controle de doenças de plantas é importante conhecer a epidemiologia e a variabilidade das populações do patógeno, o que pode determinar o potencial de adaptação do organismo às condições adversas. Uma vez que os tipos de variabilidade mais frequentemente estudados em populações de fitopatógenos são adaptações a diferentes genótipos do hospedeiro e resposta a químicos, estudos envolvendo a biologia do fitopatógeno, bem como dos componentes epidemiológicos da doença por ele incitada constituem-se importantes instrumentos da investigação (BROWN, 1998).

Período de incubação, índice de doença, taxa de progresso da doença e área abaixo da curva de progresso da doença constituem importantes instrumentos comparativos e analíticos da intensidade da doença. O período de incubação indica a velocidade com que o patógeno coloniza o hospedeiro; o índice de doença reflete a severidade da doença; a taxa de progresso da doença revela a velocidade de crescimento da severidade da doença no tempo; enquanto a área abaixo da curva de progresso da doença é a melhor representação temporal de uma epidemia, sendo utilizada para sumarizar a curva de progresso da doença (CAMPBELL; MADDEN, 1990). Esses componentes epidemiológicos foram utilizados para estudar a reação

de clones de videira quanto à resistência a *X. campestris* pv. *viticola*, observando-se correlações significativas entre os componentes estudados, indicando que qualquer um deles pode ser utilizado tanto em pesquisas envolvendo reação de clones ao cancro bacteriano da videira quanto no estudo da variabilidade do agente causal (NASCIMENTO et al., 2006).

Embora a reação de diversas variedades ou híbridos de videira com diferentes níveis de resistência ao cancro bacteriano seja bem conhecida (CHAND, 1992; MALAVOLTA JR. et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2006), não se tem conhecimento do comportamento epidemiológico da doença, quando causada por isolados de *X. campestris* pv. *viticola* com diferentes níveis de agressividade. Entretanto, esta análise pode ser útil para seleção mais acurada de fontes de resistência ao cancro bacteriano.

Diversos estudos foram realizados dentro do gênero *Xanthomonas*, caracterizando-o como um dos poucos que possuem uma ampla coleção de informações obtidas com base em dados fenotípicos (bioquímicos, fisiológicos e de patogenicidade), estudos de hibridização de DNA-DNA (VAUTERIN et al., 1995), sequenciamento da região 16S do DNA ribossomal (HAUBEN et al., 1997), análises de polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (amplified fragment length polymorphism - AFLP) (RADEMAKER et al., 2000), PCR com base em sequências repetitivas (rep-PCR) (RADEMAKER et al., 2000; RADEMAKER et al., 2005) e MLSA (YOUNG et al., 2008), os quais foram empregados para estudar a variabilidade e os relacionamentos taxonômicos e filogenéticos das espécies e patovares que compõem este grupo.

A técnica de hibridização DNA-DNA, considerada como “padrão ouro” em taxonomia bacteriana, tem sido utilizada para caracterizar o conceito operacional de espécies (ALMEIDA et al., 2010; WAYNE et al., 1987). No entanto, esta técnica é extremamente laboriosa, de custo elevado, demanda muito tempo de análise, é de difícil padronização entre laboratórios (ALMEIDA et al., 2010), não é aplicada à bactérias fastidiosas e apresenta limitações para espécies bacterianas de crescimento lento (GEVERS et al., 2005). Por sua vez, a técnica de análise da região 16S do DNA ribossomal, a qual também é utilizada para identificação de espécies bacterianas, apresenta limitações pelo fato dessa região não ser suficientemente diversificada para permitir a separação de espécies estreitamente relacionadas (GEVERS et al., 2005).

Algumas técnicas de “fingerprinting” do DNA genômico tais como AFLP e rep-PCR, além de serem extremamente importantes para estudos de diversidade e variabilidade genética, também podem ser usadas para inferir relações genotípicas ou taxonômicas entre fitobactérias. A principal evidência que apóia esta hipótese deriva de comparações detalhadas

entre agrupamentos genotípicos gerados por meio de “fingerprinting” e análises de hibridização DNA-DNA (RADEMAKER et al., 2005).

Isolados de *Xanthomonas* pertencentes a 20 grupos definidos por meio de hibridização DNA-DNA (VAUTERIN et al., 1995) e diversas outras espécies e patovares do gênero, apresentaram um elevado grau de correlação entre valores de similaridade obtidos com base em dados de AFLP e rep-PCR e valores de homologia DNA-DNA. Além disso, 19 dos 20 grupos definidos por Vauterin et al. (1995) corresponderam diretamente aos grupos derivados de “fingerprintings” gerados por meio de AFLP ou rep-PCR (RADEMAKER et al., 2000). Por conseguinte, tanto AFLP quanto rep-PCR podem ser utilizadas como técnicas de rotina para identificação de espécies e em caracterizações polifásicas para descrição de novas espécies ou combinações (STACKEBRANDT et al., 2002).

A análise de rep-PCR foi desenvolvida com base na ocorrência de três sequências repetitivas e conservadas ao longo do genoma de diversas bactérias. Essas sequências são chamadas de REP (Repetitive Extragenic Palindromic), ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) e elementos BOX, e são utilizadas para gerar “fingerprintings” que refletem a estrutura genômica de espécies de *Xanthomonas* e *Pseudomonas* Migula (LOUWS et al., 1994). Adicionalmente, rep-PCR caracteriza-se como uma técnica simples, rápida e reprodutível para identificação e classificação de isolados bacterianos (LOUWS et al., 1994; LOUWS; RADEMAKER; DE BRUIJN, 1999; STACKEBRANDT et al., 2002).

O conhecimento da variabilidade genética dos fitopatógenos auxilia o entendimento sobre a evolução da espécie e formação de novas espécies e raças, além de ser importante quando se trata do desenvolvimento de métodos eficientes e rápidos de diagnose, detecção e controle (COSTA; MARIANO; MICHEREFF, 2001). Diversos estudos utilizaram a técnica de rep-PCR para caracterização da diversidade genética de *Xanthomonas* spp. (GAMA et al., 2011; LOUWS et al., 1994; MARQUES, 2007; MASSOMO et al., 2003; RADEMAKER et al., 2000; RADEMAKER et al., 2005; TRINDADE; LIMA; FERREIRA, 2005). Utilizando esta técnica, Trindade, Lima e Ferreira (2005) e Marques (2007) verificaram a formação de cinco subgrupos em populações distintas de *X. campestris* pv. *viticola*, indicando variabilidade entre os isolados. De acordo com Trindade, Lima e Ferreira (2005), a técnica de rep-PCR é uma ferramenta valiosa para identificação e monitoramento da diversidade genética de *X. campestris* pv. *viticola*.

Recentemente, a nova técnica MLSA, baseada em análises de sequências multilocus, vem sendo utilizada para o delineamento mais refinado de espécies de *Xanthomonas* e outras fitobactérias (ALMEIDA et al., 2010; AH-YOU et al., 2009; YOUNG et al., 2008). Nessa

técnica, sequências de nucleotídeos de vários genes são comparadas, gerando informações sobre a diversidade e o relacionamento de táxons por meio de análises filogenéticas (NASER et al., 2005).

Os genes mais utilizados em MLSA são geralmente os “genes housekeeping”, ou seja, aqueles que conferem funções metabólicas básicas essenciais e apresentam-se suficientemente conservados para realização de inferências filogenéticas (ALMEIDA et al., 2010). Diversos “genes housekeeping” podem ser utilizados em MLSA (RODRIGUEZ-R. et al., 2012), destacando-se: *atpD* (subunidade β da F1-Fo ATP sintase), *dnaK* (proteína de choque térmico, Hsp70), *gyrB* (subunidade β da girase do DNA), *fyuA* (receptor dependente do sistema TonB) e *rpoD* (fator sigma RNA polimerase), os quais foram recentemente empregados de forma bem sucedida para delimitar isolados de *Xanthomonas* spp. (AH-YOU et al., 2009; YOUNG et al., 2008).

Young et al. (2008) utilizaram MLSA com os genes *dnaK*, *gyrB*, *fyuA* e *rpoD* para analisar o relacionamento das *Xanthomonas* spp. cujos epítetos foram validamente publicados. Segundo os autores, a técnica foi eficiente para diferenciação dos grupos anteriormente estabelecidos por hibridização DNA-DNA (VAUTERIN et al., 1995). Além disso, a matriz de similaridade gerada a partir das sequências analisadas indicou claras diferenças numéricas, as quais podem vir a formar a base para diferenciação de espécies no futuro como uma alternativa à técnica de hibridização DNA-DNA (YOUNG et al., 2008).

Dentre outras técnicas, Ah-You et al. (2009) utilizaram MLSA com os genes *atpD*, *fyuA* e *gyrB* e hibridização DNA-DNA para analisar patovares de *X. axonopodis* associados a família Anacardiácea. Com base em dados de hibridização DNA-DNA, os quais foram consistentes com os dados MLSA, os autores verificaram que os pvs. *mangiferaeindicae* e *anacardii* possuem níveis de similaridade consistentes, sendo membros da mesma espécie. Assim, os autores apoiaram a elevação de *X. axonopodis* pv. *citri* ao nível de espécie como *X. citri* e, conseqüentemente, reclassificaram os pvs. *mangiferaeindicae* e *anacardii* como *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* e *X. citri* pv. *anacardii*. No entanto, conforme mencionado anteriormente, esses epítetos não foram devidamente validados (BULL et al., 2012).

De acordo com Young et al. (2008), MLSA apresenta-se como um ferramenta robusta que pode ser útil para diferenciação de espécies pelo fato de gerar grupos de *Xanthomonas* spp. semelhantes aqueles formados por meio de hibridização DNA-DNA (VAUTERIN et al., 1995), AFLP (RADEMAKER et al., 2000) e rep-PCR (RADEMAKER et al., 2000; RADEMAKER et al., 2005). Portanto, MLSA caracteriza-se como uma técnica refinada para diferenciação de espécies bacterianas, podendo ser utilizada para determinar o real

posicionamento taxonômico de *X. campestris* pv. *viticola* bem como para investigar as relações filogenéticas existentes entre essa bactéria e isolados de *X. axonopodis* patogênicos a hospedeiros da família Anacardiaceae.

Devido à alta plasticidade genética e ao grau de dependência em relação aos fatores ambientais, os agentes fitopatogênicos estão mais sujeitos a variações genotípicas e fenotípicas do que os vegetais superiores (AZEVEDO, 1998). Neste contexto, quando um novo caráter para virulência surge em um mutante, este poderá fazer parte dos processos de recombinação gênica (transformação, conjugação e transdução), podendo gerar indivíduos com níveis diferentes de virulência daqueles isolados que o originaram. Dessa forma, fitopatógenos podem adquirir habilidades tais como: tolerância a substâncias tóxicas, utilização de novas substâncias para crescimento e mudanças na virulência em relação às plantas hospedeiras (CASELA; GUIMARÃES, 1996). Portanto, embora algumas características a respeito da variabilidade de *X. campestris* pv. *viticola* sejam conhecidas (relação com outras hospedeiras e formação de subgrupos genômicos), é importante que estudos mais aprofundados sejam realizados analisando-se aspectos relacionados ao comportamento metabólico, epidemiológico e genético desta fitobactéria.

Diante do exposto, a presente pesquisa teve como objetivos: I) realizar uma caracterização polifásica com isolados de *X. campestris* pv. *viticola* coletados desde a primeira ocorrência da doença no Brasil em 1998 até o ano de 2012 por meio dos perfis: metabólico, utilizando-se testes bioquímicos e fisiológicos, o sistema Biolog[®] e a sensibilidade a antibióticos; molecular, utilizando-se a técnica de rep-PCR e; epidemiológico, utilizando-se videiras artificialmente inoculadas; e II) analisar o relacionamento filogenético entre isolados de *X. campestris* pv. *viticola* e isolados de *X. axonopodis* patogênicos a hospedeiros da família Anacardiaceae por meio dos perfis descritos acima e da técnica de MLSA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AH-YOU, N.; GAGNEVIN, L.; CHIROLEU, F.; JUEN, E.; RODRIGUES NETO, J.; PRUVOST, O. Pathological variations within *Xanthomonas campestris* pv. *maniferaeindicae* supported its separation into three distinct pathovars that can be distinguished by amplified fragment length polymorphism. **Phytopathology**, St. Paul, v. 97, n.12, p.1568-1577, 2007.

AH-YOU, N.; GAGNEVIN, L.; GRIMONT, P. A. D.; BRISSE, S.; NESME, X.; CHIROLEU, F.; BUI THI NGOC, L.; JUEN, E.; LEFEUVRE, P.; VERNIÈRE, 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.

ALMEIDA, N. F.; YAN, S. C.; CAI, R. M.; CLARKE, C. R.; MORRIS, C. E.; SCHAAD, N. W.; SCHUENZEL, E. L.; LACY, G. H.; SUN, X. A.; JONES, J. B.; CASTILLO, J. A.; BULL, C. T.; LEMAN, S.; GUTTMAN, D. S.; SETUBAL, J. C.; VINATZER, B. A. PAMDB, A multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated Microbes. **Phytopathology**, St. Paul, v. 100, n. 3, p. 208-215, 2010.

AMORIM, L.; KUNIYUKI, H. Doenças da videira (*Vitis* sp.). In: KIMATI, H. et al. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 2005. v. 2, p.639-651.

ARAUJO, J. S. P. **Perfil epidemiológico e subsídios para o controle de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, agente do cancro bacteriano da videira (*Vitis vinifera*) no Brasil**. 2001. 61 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.

ARAUJO, J. S. P.; REIS JÚNIOR, F. B.; CRUZ, G. B.; OLIVEIRA, B. C.; ROBBS, C. F.; RIBEIRO, R. L. D.; POLIDORO, J. C. Produção e caracterização de anticorpos policlonais contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.3, p.305-309, 2005.

AZEVEDO, J. L. **Genética de microrganismos**. Goiânia: Editora da UFG, 1998. 490 p.

BIOLOG. **User's guide**. Hayward: Biolog Inc., 2010, 87 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 20 de 27 de setembro de 2001. Aprova as diretrizes para a produção integrada de frutas – DGPIF e as normas técnicas gerais

para a produção integrada de frutas. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=3915>> Acesso em: 03 nov. 2009.

BROWN, J. K. M. Surveys of variation in pathogen population and their applications to disease control. In: JONES, G. (Ed.). **The epidemiology of plant disease**. Dordrecht: Kluwer, 1998. p. 73-102.

BUENSANTEAI, M. N. **Identification, development of detection method and survey of bacterial necrosis disease of grapevine in Thailand**. 2004. Dissertação (Mestrado em Tecnologia da Produção de Alimentos) – Suranaree University of Technology, Muang District.

BULL, C. T.; DE BOER, S. H.; DENNY, T. P.; FIRRAO, G.; FISCHER-LE SAUX, M.; SADDLER, G. S.; SCORTICHINI, M.; STEAD, D. E.; TAKIKAWA, Y. Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980-2007. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 92, n. 3, p. 551-592, 2010.

BULL, C. T.; DE BOER, S. H.; DENNY, T. P.; FIRRAO, G.; FISCHER-LE SAUX, M.; SADDLER, G. S.; SCORTICHINI, M.; STEAD, D. E.; TAKIKAWA, Y. List of new names of plant pathogenic bacteria (2008-2010). **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 94, n. 1, p. 21-27, 2012.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley & Sons, 1990. 532 p.

CASELA, C. B.; GUIMARÃES, F. B. Especialização fisiológica de fungos fitopatogênicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, p. 75-93, 1996.

CHAND, R. Sources of resistance to grapevine bacterial canker disease in *Vitis*. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, New Delhi, v.31, p.83-86, 1992.

CHAND, R.; KISHUN, R. Outbreak of grapevine bacterial canker disease in India. **Vitis**, Bangalore, v. 29, n. 291/88, p. 183-188, 1990.

CHAND, R.; PATIL, P. B.; KISHUM, R. Management of bacterial canker disease (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*) of grape vine (*Vitis vinifera*) by pruning. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, New Delhi, v. 61, n. 3, p. 220-222, 1991.

COSTA, V. S. O.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J. Variabilidade de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* no estado de Pernambuco. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 24, n. 2, 182-189, 2001.

FERREIRA-TONIN, M. **Caracterização taxonômica de espécies do gênero *Xanthomonas***. 2012. 82 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

FERREIRA-TONIN, M.; CORRÊA, D. B. A.; DESTÉFANO, S. A. L. Classificação de linhagens de *Xanthomonas* sp. por *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) e hibridização DNA-DNA. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, XLIV, 2011, Bento Gonçalves, **Proceedings...** Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2011, p. 128, resumo 906.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT 2011**. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2011. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/T/TP/E>>. Acesso em: 02 jan. 2014.

FREIRE, F. C. O.; OLIVEIRA, A. D. S. **Ocorrência do cancro bacteriano da videira no estado do Ceará**. Fortaleza: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2001, 2p. (EMBRAPA – EMBRAPA AGROINDÚSTRIA TROPICAL. Comunicado Técnico, 62).

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**, St. Paul, v. 95, n. 7, p. 793-802, 2011.

GEVERS, D.; COHAN, F. M.; LAWRENCE, J. G.; SPRATT, B. G.; COENYE, T.; FEIL, E. J.; STACKEBRANDT, E.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F. L.;

SWINGS, J. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 3, n. 9, p.733-739, 2005.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **SIDRA 2012**: sistema IBGE de recuperação automática. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2009. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1613&z=p&o=18&i=P>. Acesso em: 11 nov. 2013.

INSTRUÇÃO NORMATIVA SDA Nº 38, de 14 de outubro de 1999. **DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO**, Brasília, 26 de outubro de 1999, seção 1, p. 23.

INSTRUÇÃO NORMATIVA SDA Nº 9, de 20 de abril de 2006. **DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO**, Brasília, 26 de abril de 2006, seção 1, p. 1.

INSTRUÇÃO NORMATIVA SDA Nº 59, de 20 de dezembro de 2007. **DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO**, Brasília, 21 de dezembro de 2007, seção 1, p. 49.

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

KOCHENKO, Z. I. Development of canker tumours on grape roots. **Zashchita-Rastenii**, Moscou, v. 7, p. 42-43, 1993.

KUHN, G. B.; FAJARDO, T. V. M. **Uvas viníferas para processamento em regiões de clima temperado**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/UvasViniferasRegioesClimaTemperado/virus.htm>>. Acesso em: 28 jan. 2011.

LAZZAROTTO, J. J.; FIORAVANÇO, J. C. Tendências e sazonalidades nas exportações e importações brasileiras de uva de mesa. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 43, n. 1, 2013.

LEÃO, P. C. S. **Cultivo da videira**. Petrolina: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA SEMI-ÁRIDO, 2004. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/CultivodaVideira/index.htm>>. Acesso em: 13 dez. 2013.

LEÃO, P. C. S.; SOARES, J. M. (Eds.). **A viticultura no semi-árido brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2000. 368 p.

LIMA, M. F.; FERREIRA, M. A. S. V.; MOREIRA, W. A.; DIANESE, J. C. Bacterial canker of grapevine in Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 3, p. 440-443, 1999.

LIMA, M. F.; MOREIRA, W. A. Doenças causadas por bactérias. In. ALENCAR, J. A. **Uva de mesa: fitossanidade**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2002. p. 27-34. (EMBRAPA INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA. Frutas do Brasil).

LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. **Doenças bacterianas das Hortaliças: Diagnose e controle**. Brasília: EMBRAPA - CNPH, 1997. 70 p.

LOPES, D. B. L.; NASCIMENTO, A. R. P. Situação atual do cancro bacteriano da videira no semi-árido nordestino. In: Seminário novas perspectivas para o cultivo de uvas sem sementes no Vale do São Francisco. Junho, 2004. Petrolina: Embrapa Semiárido. (Documento 185).

LOUWS, E. J.; FULBRIGHT, D. W.; STEPHENS, C. T.; BRUIJN, F. J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 7, p. 2286-2295, 1994.

LOUWS, E. J.; RADEMAKER, J. L. W.; BRUIJN, F. J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto-bacteria: diversity, detection and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopatology**, Palo Alto, v. 37, p. 81-125, 1999.

MALAVOLTA JR., V. A.; ALMEIDA, I. M. G. Patogenicidade de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em neem. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 287, 2000.

MALAVOLTA JR., V. A.; ALMEIDA, I. M. G.; SUGIMORI, M. H.; RIBEIRO, I. J. A.; RODRIGUES NETO, J.; PIRES, E. J. P.; NOGUEIRA, E. M. C. Ocorrência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videira no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 26-27, 1999.

MALAVOLTA JR., V. A.; SUGIMORI, M. H.; ALMEIDA, I. M. G.; RIBEIRO, I. J. A. Resistência de variedades de videira a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 3, p. 373-376, 2003.

MAREFAT, A. **Identification, diversity and detection of *Xanthomonas* strains associated with pistachio dieback in Australia**. 2006. 93 f. (Doutorado em Doença de Plantas) – University of Adelaide – Australia.

MARQUES, E. **Variabilidade e tolerância ao cobre em *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* agente causal do cancro bacteriano da videira *Vitis* spp.** 2007. 65 f. (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília.

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

MASSOMO, S. M. S.; NIELSEN, H.; MABAGALA, R. B.; MANSFELD-GIESE, K.; HOCKENHULL, J.; MORTENSEN, C. N. Identification and characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strains from Tanzania by pathogenicity tests, Biolog, rep-PCR and fatty acid methyl ester analysis. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, n. 8, p. 775–789, 2003.

MELLO, L. M. R. **Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2006**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2006. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/panorama2006_vitivinicultura.pdf>. Acesso em: 13 dez. 2013.

MURRAY, R. G. E.; BRENNER, D. J.; COLWELL, R. R.; DE VOS, P.; GOODFELLOW, M.; GRIMONT, P. A. D.; PFENNIG, N.; STACKEBRANDT, E.; ZAVARZIN, G. A. Report of the ad hoc committee on approaches to taxonomy within the *Proteobacteria*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 40, n. 2, p. 213–215, 1990.

NASCIMENTO, A. R. P. **Cancro bacteriano (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*) da videira (*Vitis* spp.): métodos de preservação e crescimento de isolados; escala diagramática e reação de variedades de videira à doença**. 2005. 48 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

NASCIMENTO, A. R. P.; MARIANO, R. L. R. Cancro bacteriano da videira: etiologia, epidemiologia e medidas de controle. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n.1, p. 301-307, 2004.

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

NASCIMENTO, A. R. P.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R.; VIANA, I. O. Reação de clones de videira a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, baseada nos componentes epidemiológicos do cancro bacteriano. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 1-7, 2006.

NASER, S. M.; THOMPSON, F. L.; HOSTE, B.; GEVERS, D.; DAWYNDT, P.; VANCANNEY, M.; SWINGS, J. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. **Microbiology**, Reading, v. 151, n. 7, p. 2141-2150, 2005.

NAYUDU, M. V. *Pseudomonas viticola* sp. nov., incitant of a new bacterial disease of grapevine. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 73, n. 12, p. 183-186, 1972.

OLIVEIRA, J. R.; ROMEIRO, R. S. LACERDA, B. S. L. Occurrence of *Agrobacterium tumefaciens* biovar B on grapevine in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 140, n. 4, p. 363-366, 1994.

PEIXOTO, A. R.; MARIANO, R. L. R.; MOREIRA, J. O. T.; VIANA, I. O. Hospedeiros alternativos de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 161-164, 2007.

PEIXOTO, A. R.; MARIANO, R. L. R.; VIANA, I. O. Meio semi-seletivo para isolamento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 1317-1320, 2006.

POMMER, C. V. (Ed.). **Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes Editora Ltda., 2003. 777 p.

PRAKASH, O.; VERMA, M.; SHARMA, P.; KUMAR, M.; KUMARI, K.; SINGH, A.; KUMARI, H.; JIT, S.; GUPTA, S. K.; KHANNA, M.; LAL, R. Polyphasic approach of bacterial classification – An overview of recent advances. **Indian Journal of Microbiology**, Delhi, v. 47, n. 2, p. 98-108, 2007.

RADEMAKER, J. L. W.; HOSTE, B.; LOWUS, F. J.; KERSTERS, K.; SWINGS, J.; VAUTERIN, L.; VAUTERIN, P.; BRUIJN, F. L. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA- DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 50, n. 2, p. 665-677, 2000.

RADEMAKER, J. L. W.; LOUWS, F. J.; SCHULTZ, M. H.; ROSSBACH, U.; VAUTERIN, L.; SWINGS, J.; BRUIJN, F. J. A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 95, n. 9, p. 1098-1111, 2005.

RODRIGUEZ-R, L. M.; GRAJALES, A.; ARRIETA-ORTIZ, M. L.; SALAZAR, C.; RESTREPO, S.; BEMAL, A. Genome-based phylogeny of the genus *Xanthomonas*. **BMC Microbiology**, London, v. 12, n. 43, p. 1-14, 2012.

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

ROMEIRO, R. S.; OLIVEIRA, J. R.; MOURA, A. B.; BARBOSA, L. S.; MIGUEL, D. S.; SOARES, F. M. P.; PERES, F.; SIMÕES, A. R. Significado biológico da sensibilidade diferencial de fitobactérias a antibióticos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília v. 18, p. 277, 1993 (Resumo).

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 3rd ed. St. Paul: APS Press, 2001. 373 p.

SILVA, A. M. F. **Limpeza clonal de videira com cancro-bacteriano e sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em tecidos infectados**. 2009. 45 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

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

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G. M.; GRIMONT, P. A. D.; KÄMPFER, J.; MAIDEN, M. C. J.; NESME, X.; ROSSELLÓ-MORA, R.; SWINGS, J.; TRÜPER, H. G.; VAUTERIN, L.; WARD, A. C.; WHITMAN, W. B. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 52, n. 3, p. 1043-1047, 2002.

TAKITA, M. A.; BORGES, K. M.; REIS, M. S.; DESTEFANO, S. A. L. MACHADO, M. A. Analysis of genomic sequences of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* gives support to a

taxonomic reclassification. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, XXXV, 2006, Águas de Lindóia. **Proceedings...** [Impresso]. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. p. 56, resumo 0968.

TAKITA, M. A.; SOUZA, A.; BORGES, K. M.; COLETA-FILHO, H. D.; RODRIGUES NETO, J.; MACHADO, M. A. A região *rpf* (regulation of pathogenicity factors) distingue espécies de *Xanthomonas*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 254, 2004.

TAVARES, S. C. C. H. **Principais doenças das culturas de: manga, uva, acerola e banana**. Petrolina: Embrapa CPATSA, 1995. (EMBRAPA. Apostila do Curso de Atualização Técnica para Engenheiros Agrônomos do Banco do Brasil, 1).

TERRAL, J. F.; TABARD, E.; BOUBY, L.; IVORRA, S.; PASTOR, T.; FIGUEIRAL, I.; PICQ, S.; CHEVANCE, J. B.; JUNG, C.; FABRE, L.; TARDY, C.; COMPAN, M.; BACILIERI, R.; LACOMBE, T.; THIS, P. Evolution and history of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars. **Annals of Botany**, London, v. 105, p. 443–455, 2010.

TOMAZ, R.; SCREMIN, R. M.; FERREIRA, M. A. S. V.; BARBOSA, M. A. G. Detecção e erradicação de videiras com sintomas do cancro bacteriano no Estado do Paraná. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, suplemento, p.896, 2011, resumo 1289.

TRINDADE, L. C. **Diagnose Molecular do Cancro Bacteriano da Videira Causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola***. 2007. 92 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília.

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

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

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 60, n. 2, p. 408-431, 1996.

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

VERNIERE, C.; PRUVOST, O.; CIVEROLO, E. L.; GAMBIN, O.; JACQUEMOUD-COLLET, J. P.; LUISETTI, J. Evaluation of the Biolog substrate utilization system to identify and assess metabolic variation among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 1, p. 243-249, 1993.

WAYNE, L. G.; BRENNER, D. J.; COLWELL, R. R.; GRIMONT, P. A. D.; KANDLER, O.; KRICHEVSKY, M. I.; MOORE, L. H.; MOORE, W. E. C.; MURRAY, R. G. E.; STACKEBRANDT, E.; STARRR, M. P.; TRÜPER, H. G. Report of the Ad Hoc Committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 37, n. 4, p. 463-464, 1987.

YOUNG, J. M.; BRADBURY, J. F.; PANAGOPOULOS, C. G.; ROBBS, C. F. A proposed nomenclature and classification for pathogenic bacteria. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 21, n. 1, p. 153-177, 1978.

YOUNG, J. M.; PARK, D. C.; SHEARMAN, H.M.; FARGIER, E. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 31, n. 5, p. 366-377, 2008.

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DE *Xanthomonas campestris* PV. *viticola*,

AGENTE CAUSAL DO CANCRO BACTERIANO DA Videira

1 **Caracterização Polifásica de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, Agente Causal**
2 **do Cancro Bacteriano da Videira**

3
4 Marco Aurélio Siqueira da Gama, Rosa de Lima Ramos Mariano, Maria Angélica
5 Guimarães Barbosa, Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira, Adriano Márcio Freire
6 da Silva, Liliana Andréa Santos, Elineide Barbosa de Souza

7
8 Primeiro, segundo, quinto e sexto autores: Fitossanidade, Departamento de Agronomia, Universidade
9 Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife-
10 PE, Brasil; terceiro autor: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Semiárido; BR 428, Km 152,
11 Zona Rural, CEP 56302-970 Petrolina-PE, Brasil; quarto autor: Instituto de Ciências Biológicas,
12 Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, Campus Universitário - ICC Sul, Asa Norte,
13 CEP 70910-900, Brasília-DF, Brasil e; sétimo autor: Microbiologia, Departamento de Biologia,
14 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP
15 52171-900, Recife-PE, Brasil.

16
17 **Resumo**

18 O cancro bacteriano da videira, causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, é
19 uma das mais importantes enfermidades na região Nordeste do Brasil, sendo
20 responsável por danos severos e representando alto potencial de risco ao
21 desenvolvimento da viticultura nacional. O presente estudo teve como objetivo
22 caracterizar a variabilidade metabólica, molecular e epidemiológica de isolados
23 brasileiros de *X. campestris* pv. *viticola* coletados nos diferentes estados onde a doença
24 já ocorreu, desde a introdução da doença no Brasil até o ano de 2012 por meio de testes
25 fenotípicos, componentes epidemiológicos e rep-PCR. Os isolados de *X. campestris* pv.
26 *viticola* formaram um grupo homogêneo composto por duas linhas evolucionárias, uma
27 linha abrigando a maioria dos isolados (110) e a outra linha abrigando seis isolados.
28 Adicionalmente, foi observada elevada variabilidade intrapatovar para isolados de um
29 mesmo táxon. Cento e vinte sete características metabólicas e os perfis moleculares e
30 epidemiológicos são apresentados, os quais permitirão a seleção de isolados

1 representativos da variabilidade de *X. campestris* pv. *viticola* para estudos visando o
2 esclarecimento dos mecanismos moleculares da interação bactéria planta, bem como
3 para obtenção de cultivares resistentes ao cancro bacteriano.

4

5 A região Nordeste é responsável por aproximadamente 19% da produção
6 brasileira de uvas (IBGE, 2013) e por mais de 99% das exportações nacionais de uvas
7 finas de mesa (LAZZAROTTO; FIORAVANÇO, 2013), o que representou
8 aproximadamente 59.400 toneladas deste produto exportadas em 2011, gerando cerca de
9 US\$ 136 milhões para economia brasileira (FAO, 2013). Dentre as doenças que
10 ocorrem na videira, atenção especial deve ser dada ao cancro bacteriano, causado por
11 *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye. Os sintomas característicos da
12 doença são cancos nos ramos, pecíolos e engaços (FREIRE; OLIVEIRA, 2001). Nas
13 folhas, observam-se pequenas lesões escuras e angulares, as quais ao coalescerem
14 necrosam grandes áreas do limbo foliar. As nervuras apresentam-se necrosadas,
15 sobretudo na face abaxial do limbo foliar (FREIRE; OLIVEIRA, 2001; MALAVOLTA
16 JR. et al., 1999; NAYUDU, 1972), sendo este um sintoma muito importante para a
17 diagnose da doença, quando as lesões foliares não são características e na ausência de
18 cancos na planta. As bagas são desuniformes em tamanho e cor, podendo apresentar
19 lesões necróticas (NASCIMENTO; MARIANO, 2004).

20

21 A ocorrência mundial do cancro bacteriano da videira é muito restrita
22 (TRINDADE; LIMA; FERREIRA, 2005), sendo aparentemente limitada ao Brasil
23 (LIMA et al., 1999; MALAVOLTA JR et al., 1999), Índia (NAYUDU, 1972), Tailândia
24 (BUENSANTEAI, 2004) e Ucrânia (KOCHENKO, 1993). No Brasil, esta doença é
25 sendo responsável por danos severos e representando alto potencial de risco ao

26 desenvolvimento da viticultura nacional (ARAÚJO et al., 2005). Em levantamentos
27 realizados em 2004 verificou-se que de 18 propriedades visitadas, 17 apresentaram
28 videiras com sintomas do cancro bacteriano, ou seja, prevalência de 94,4%. Nestas
29 propriedades, a incidência variou de 10 a 100% e de 92 a 100% em parcelas com as
30 cultivares Sugaone e Red Globe, respectivamente (LOPES; NASCIMENTO, 2004). Na
31 Índia, parreirais infectados podem sofrer perdas que variam entre 60% e 80% da
32 produção (CHAND; KISHUN, 1990). Na Tailândia, o cancro bacteriano da videira
33 encontra-se amplamente distribuído (BUENSANTEAI, 2004), entretanto não existem
34 informações disponíveis sobre o impacto da doença neste país. A ocorrência de uma
35 bactéria causadora de cancros em videiras também foi registrada na Ucrânia, embora
36 sem deixar evidente o agente causal da doença (KOCHENKO, 1993).

37 O cancro bacteriano da videira foi observado pela primeira vez em 1969 em
38 parreirais (cv. Anab-e-Shahi) do Colégio Agrícola de Tirupati na Índia (NAYUDU,
39 1972). No entanto, a doença só foi detectada no Brasil em 1998, em parreirais do
40 Nordeste brasileiro, mais precisamente no estado de Pernambuco (LIMA et al., 1999;
41 MALAVOLTA JR et al., 1999), onde a doença foi inadvertidamente introduzida por
42 produtores a partir de bacelos contaminados (cv. Red Globe) oriundos da Índia
43 (FREIRE; OLIVEIRA, 2001). Ainda no ano de 1998, o cancro bacteriano foi relatado
44 nos estados da Bahia e Piauí (LIMA et al., 1999; MALAVOLTA JR. et al., 1999),
45 sendo, posteriormente, observado nos estados do Ceará (FREIRE; OLIVEIRA, 2001),
46 Goiás (JUNQUEIRA et al., 2006), Minas Gerais (JUNQUEIRA et al., 2006;
47 MARQUES, 2007), Paraná (TOMAZ et al., 2011), Roraima (HALFELD-VIEIRA;
48 NECHET, 2006) e São Paulo (RODRIGUES NETO et al., 2011). A doença foi
49 erradicada da maioria desses estados, estando presente atualmente apenas na Bahia,
50 Ceará e Pernambuco (Instrução Normativa Nº 59/2007), onde se encontra sob controle

51 oficial (BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E
52 ABASTECIMENTO, 2008).

53 Desde 1995, após o primeiro estudo de hibridização DNA-DNA, dentro do
54 gênero *Xanthomonas* Dowson a espécie *X. campestris* passou a designar apenas
55 isolados patogênicos a brassicáceas. Nesta ocasião, foi sugerido que o patovar *viticola* e
56 outros patovares de *X. campestris* não reclassificados deveriam ser cuidadosamente
57 analisados por meio de abordagens polifásicas e alocados para outras espécies ou
58 elevados ao nível de espécie (VAUTERIN et al., 1995). Recentemente foi demonstrado
59 por meio de comparações genômicas (TAKITA et al., 2006), análises de sequências
60 multilocus (multilocus sequence analysis - MLSA) e hibridização DNA-DNA
61 (FERREIRA-TONIN, 2012; FERREIRA-TONIN et al., 2011) que o patovar *viticola*
62 pertence à espécie *X. axonopodis* Starr e Garces. No entanto, até o momento, nenhum
63 estudo propôs a reclassificação de *X. campestris* pv. *viticola*. Por sua vez, o Comitê de
64 Taxonomia de Fitobactérias da Sociedade Internacional de Fitopatologistas (Committee
65 on the Taxonomy of Plant Pathogenic Bacteria - International Society of Plant
66 Pathology) recomenda o uso do epíteto *X. campestris* pv. *viticola* (BULL et al., 2010), o
67 qual vem sendo comumente empregado tanto em periódicos indexados quanto pela
68 legislação brasileira, razões pelas quais foi utilizado no presente estudo.

69 Ao longo dos anos, diversas pesquisas foram realizadas dentro do gênero
70 *Xanthomonas*, caracterizando-o como um dos poucos que possuem uma ampla coleção
71 de informações obtidas com base em dados fenotípicos (bioquímicos, fisiológicos e de
72 patogenicidade) e moleculares (AH-YOU et al., 2009; FERREIRA-TONIN, 2012;
73 GAMA et al., 2011; HAUBEN et al., 1997; LOUWS et al., 1994; MARQUES, 2005;
74 RADEMAKER et al., 2000; RADEMAKER et al., 2005; TRINDADE et al., 2005;
75 VAUTERIN et al., 1995; YOUNG et al., 2008). Tais conhecimentos foram empregados

76 para estudar a variabilidade e os relacionamentos taxonômicos e filogenéticos das
77 espécies e patovares que compõem este grupo. No entanto, poucos estudos avaliaram a
78 estrutura populacional de *X. campestris* pv. *viticola*, os quais restringem-se a
79 caracterizações da variabilidade genética (TRINDADE et al., 2005; MARQUES, 2007)
80 e da sensibilidade/tolerância a cúpricos (MARQUES, 2007). O conhecimento da
81 variabilidade genética dos fitopatógenos auxilia o entendimento sobre a evolução da
82 espécie e formação de novas espécies e raças, além de ser importante quando se trata do
83 desenvolvimento de métodos eficientes e rápidos de diagnose, detecção e controle
84 (COSTA; MARIANO, MICHEREFF, 2001). Portanto, o presente estudo teve como
85 objetivo caracterizar a variabilidade metabólica, molecular e epidemiológica de isolados
86 brasileiros de *X. campestris* pv. *viticola* coletados nos diferentes estados onde a doença
87 já ocorreu, desde a introdução da doença no Brasil, em 1998, até o ano de 2012.

88

89 **Material e Métodos**

90 **Isolados bacterianos, condições de cultivo e testes de patogenicidade.** Foi
91 utilizada uma coleção formada por 115 isolados brasileiros de *X. campestris* pv.
92 *campestris* coletados entre os anos de 1998 (ano de introdução da doença) a 2012
93 (Tabela 1). A maioria desses isolados ($\pm 95\%$) foi coletada nos estados da Bahia e
94 Pernambuco (Vale do Submédio São Francisco), onde o cancro bacteriano apresenta-se
95 como um fator limitante a viticultura. Excetuando-se os estados de Goiás e Piauí, no
96 mínimo um isolado oriundo dos demais estados brasileiros onde a doença já ocorreu
97 (Ceará, Minas Gerais, Paraná, Roraima e São Paulo) foi incluído neste estudo. Para fins
98 comparativos, o isolado patótipo de *X. campestris* pv. *viticola* (IBSBF1967 – oriundo da
99 Índia) e o isolado PST de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* da Coleção de Culturas do
100 Laboratório de Fitobacteriologia (LAFIBAC) da Universidade Federal Rural de

101 Pernambuco - Pernambuco, Brasil também foram incluídos na coleção, totalizando 117
102 isolados.

103 Exceto quando especificado no experimento, os isolados foram cultivados em
104 meio NYDA (20 g de ágar, 10 g de dextrose, 5 g de peptona, 5 g de extrato de levedura
105 e 3 g de extrato de carne completando-se o volume com água destilada esterilizada
106 (ADE) até 1000 ml) por 36 h a 29°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$).

107 A patogenicidade dos isolados foi testada em mudas de videira (*Vitis vinifera* L.
108 cv. Red Globe) com aproximadamente 100 dias, conforme descrito em outros estudos
109 (AH-YOU et al., 2007; GAMA et al., 2011). As concentrações das suspensões
110 bacterianas foram ajustadas com auxílio de espectrofotômetro (Analyser 500 M, São
111 Paulo, Brasil) para $A_{570} = 0,4$ (10^8 UFC/ml). Em seguida, 100 μl da suspensão foram
112 infiltrados com auxílio de seringa hipodérmica sem agulha em seis pontos do limbo
113 foliar (sendo utilizadas as primeiras oito folhas de cada muda, a partir do ápice). O
114 delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com duas repetições,
115 sendo cada repetição constituída por uma folha com seis pontos de inoculação por
116 isolado. O controle negativo consistiu de folhas inoculadas apenas com ADE. O
117 reisolamento do patógeno foi realizado a partir de lesões características da doença, 7-10
118 dias após as inoculações, em meio NYDA suplementado ou não com ampicilina (100
119 mg/l), completando-se os Postulados de Koch. Posteriormente, os isolados foram
120 depositados na Coleção de Culturas do LAFIBAC. Para a execução dos experimentos
121 descritos abaixo, os isolados foram mantidos em repicagens periódicas a cada cinco dias
122 em meio NYDA.

123 **Caracterização fenotípica.** Foram estudadas 127 características fenotípicas: 14
124 testes bioquímicos-fisiológicos convencionais (SCHAAD et al., 2001), 94 testes
125 bioquímicos utilizando o sistema Biolog, Inc. (Hayward, Califórnia, Estados Unidos) e

126 a sensibilidade a 19 antibióticos por meio de antibiogramas com discos comerciais
127 (Laborclin LTDA, Paraná, Brasil).

128 Foram realizados testes bioquímico-fisiológicos convencionais para
129 determinação reação de Gram (KOH a 3% e coloração de Gram); relação com o
130 oxigênio; formação de colônias amarelas em meio YDC; crescimento em meio YDC a
131 33°C; catalase; oxidase; hidrólise do amido e tween 80; produção de proteases;
132 produção de pigmento fluorescente; crescimento em meio cloreto de trifetil tetrazolium
133 a 0,1%; hidrólise da ureia; e hipersensibilidade em folhas de fumo (cv. Rapé Folhice) e
134 tomateiro (cv. Santa Cruz) (SCHAAD et al., 2001). Os testes foram realizados com
135 quatro repetições, sendo cada repetição caracterizada por um tubo ou placa. Nos testes
136 de reação de hipersensibilidade, cada repetição foi caracterizada por um ponto de
137 inoculação. Todos os testes foram realizados duas vezes.

138 A caracterização bioquímica por meio do sistema Biolog, Inc. foi realizada
139 utilizando-se microplacas Biolog GenIII (71 fontes de carbono e 23 substâncias
140 inibitórias) de acordo com as recomendações do fabricante. Os isolados foram
141 cultivados em meio BUG[®] (Biolog Universal Growth) a 29°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) por 36 h e as
142 suspensões foram preparadas no fluido para inoculação IF-A, ajustando-se a
143 transmitância para 95%. Em seguida, 150 μl da suspensão foram adicionados a cada um
144 dos 94 poços das microplacas. Posteriormente, as placas foram incubadas a 33°C por 36
145 h. As avaliações foram realizadas visualmente observando-se a mudança de coloração
146 dos poços. O experimento foi repetido com 50 isolados selecionados ao acaso para
147 comprovação dos perfis gerados.

148 Testes de antibiogramas foram realizados conforme Peixoto et al. (2006),
149 utilizando-se os seguintes antibióticos comerciais: ácido pipemídico (20cg); amoxicilina
150 (30 μg); cefaclor (30 μg); cefotaxima (30 μg); ceftazidima (30 μg); ceftriaxona (30 μg);

151 ciprofloxacina (5µg); clindamicina (2µg); cloranfenicol (30µg); eritromicina (15µg);
152 estreptomicina (10µg); imipenem (10µg); norfloxacina (10µg); optoquina (5µg); oxacilina
153 (1µg); sulfazotrin (25µg); tetraciclina (30µg); ticarcilina/ácido clavulânico (85µg);
154 trimetropina (5µg). Os antibiogramas foram realizados em placas de Petri de 15 cm de
155 diâmetro contendo NYDA solidificado, sobre o qual 100µl de cada suspensão
156 bacteriana (10^8 UFC/ml) foram espalhados com auxílio de uma alça de vidro. Após
157 secagem da suspensão, 10 discos de antibióticos distintos foram depositados por placa.
158 A incubação foi realizada a 29°C durante 36 horas, quando os halos formados ao redor
159 dos discos foram medidos em sentidos diametralmente opostos com auxílio de um
160 paquímetro. Isolados que apresentaram halos de inibição foram considerados sensíveis e
161 o teste interpretado como positivo. Os testes foram realizados com duas repetições por
162 isolado, sendo cada repetição caracterizada por uma placa contendo um disco. O
163 experimento foi realizado duas vezes.

164 Os 127 testes fenotípicos realizados foram registrados como positivos (1) ou
165 negativos (0) e os perfis fenotípicos gerados foram analisados pelo programa FreeTree
166 (PAVLICEK et al., 1999). Para determinação dos relacionamentos metabólicos entre os
167 isolados utilizou-se o coeficiente de similaridade de Jaccard, sendo a árvore de distância
168 construída pelo método UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic
169 averages). A reprodutibilidade dos ramos foi estimada pelo método de *bootstrap* com
170 1000 repetições (HAMPL et al., 2001).

171 O nível médio de homogeneidade interna (*h*) foi calculado com base nas 127
172 características fenotípicas estudadas para verificar a consistência dos perfis metabólicos
173 dentro do grupo de isolados de *X. campestris* pv. *viticola* (VAUTERIN et al., 1995). O
174 valor de *h* varia de 1, quando o grupo é perfeitamente consistente, ou seja, todos os

175 isolados exibem a mesma reação para cada característica fenotípica estudada, a 0,
176 quando 50% dos isolados são positivos para cada característica.

177 **Caracterização molecular.** *Extração e quantificação de DNA genômico.* A
178 extração do DNA dos 117 isolados utilizados neste estudo foi realizada utilizando-se o
179 Kit MiniPrep para extração de DNA genômico bacteriano (Axygen Biosciences, EUA)
180 seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação do DNA genômico foi
181 realizada por meio de análise comparativa com o marcador High DNA Mass Ladder
182 (Invitrogen, Brasil), utilizando-se uma mistura contendo 4 µl do DNA concentrado
183 adicionado a 2 µl de tampão de carregamento 6X DNA Loading Dye (Fermentas Life
184 Sciences, Canadá) e 1,5 µl de SYBER[®] Safe DNA Gel Stain (10X) (Life Technologies,
185 São Paulo, Brasil). A análise foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a
186 1% preparado em tampão TBE 0,5X (5,4 g de Tris-base; 2,75 g de ácido bórico e 0,375
187 g de EDTA, para 1000 ml) por 1,5 h a 80 V. Posteriormente, o gel foi fotodocumentado
188 e, após a quantificação, as amostras foram diluídas para uma concentração final de 10
189 ng/µl de DNA, sendo armazenadas a -20°C.

190 *Identificação molecular.* A identificação molecular foi realizada com os *primers*
191 Xcv1F (5' TGCAGGTGAGCTGTGC 3')/Xcv3R (5' AGTTCGACCACCTTGCCATA
192 3'), os quais amplificam um fragmento de 243 pb do gene *hrpB* (TRINDADE et al., 2007).
193 As reações foram compostas por: 1X de PCR Master Mix 2X (0,05 U/µl de Taq DNA
194 polimerase, tampão de reação, 4 mM de MgCl₂, 0,4 mM de cada dNTP), 0,5 µM de
195 cada *primer* e 200 ng de DNA. As amostras foram amplificadas em termociclador
196 modelo PTC-100 (MJ Research, Estados Unidos) e submetidas às seguintes condições:
197 95°C por 2 min, seguindo-se 30 ciclos de 1 min a 95°C para desnaturação, 1 min a 64°C
198 para anelamento dos *primers* e 2 min a 72°C para extensão da nova fita. Para a extensão
199 final, foi realizado um ciclo de 10 min a 72°C. Controles negativos (reações livres de

200 DNA) foram incluídos em todos os experimentos para verificar a presença de
201 contaminantes. De cada reação de amplificação 12 µl foram misturados 3 µl do tampão
202 de carregamento e 2,5 µl de SYBER[®] Safe, aplicando-se um volume total de 17,5 µl em
203 cada poço do gel. A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada em gel de
204 agarose a 1% e a corrida eletroforética realizada durante 1,5 h a 80 V em tampão TBE
205 0,5X, utilizando-se o marcador GenRuler 1kp DNA Ladder (Fermentas Life Sciences,
206 Canadá). Posteriormente, o gel foi fotodocumentado. As análises foram realizadas duas
207 vezes.

208 *Análise de rep-PCR.* As reações de REP, ERIC e BOX foram realizadas segundo
209 Louws et al. (1994), com algumas modificações: 1X de PCR Master Mix 2X, 2 µM de
210 cada *primer* e 200 ng de DNA. As amostras foram amplificadas em termociclador
211 modelo PTC-100. Controles negativos (reações livres de DNA) foram incluídos em
212 todos os experimentos para verificar a presença de contaminantes. A coloração das
213 reações de amplificação foi realizada conforme descrito anteriormente e a visualização
214 dos fragmentos amplificados foi realizada em gel de agarose a 1,5%. A corrida
215 eletroforética foi realizada durante 3 h a 80 V em tampão TBE 0,5X, utilizando-se os
216 marcadores GenRuler 100bp DNA Ladder (Fermentas Life Sciences, Canadá) e
217 GenRuler 1kb bp DNA Ladder (Fermentas Life Sciences, Canadá). Posteriormente, o
218 gel foi fotodocumentado. As análises foram realizadas duas vezes.

219 As análises dos perfis de amplificação gerados com os *primers* REP, ERIC e
220 BOX foram realizadas visualmente de acordo com a presença (1) ou ausência de bandas
221 (0) de 100 a 3000 pb, sendo registradas apenas bandas reprodutíveis (presentes nas duas
222 análises). Os dados gerados com cada *primer* foram analisados separadamente e em
223 conjunto pelo programa FreeTree (PAVLICEK et al., 1999). Para determinação dos
224 relacionamentos genéticos entre os isolados foi utilizado o coeficiente de similaridade

225 de Jaccard, sendo a árvore de distância construída pelo método UPGMA. Análises de
226 *bootstrap* com 1000 repetições foram conduzidas para avaliar a consistência interna dos
227 ramos (HAMPL et al., 2001).

228 **Caracterização epidemiológica.** Os 116 isolados de *X. campestris* pv. *viticola*
229 utilizados neste estudo foram inoculados em folhas de mudas de videira (*V. vinifera* cv.
230 Red Globe) com auxílio de seringa hipodérmica sem agulha em quatro pontos do limbo
231 foliar conforme descrito anteriormente (AH-YOU et al., 2007; GAMA et al., 2011).
232 Folhas inoculadas apenas com ADE constituíram o controle negativo. O delineamento
233 experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo cada
234 repetição constituída por uma folha com quatro pontos de inoculação por isolado. Após
235 as inoculações, as mudas foram incubadas em casa de vegetação e avaliadas diariamente
236 durante 23 dias para determinação do período de incubação, que é o número de dias
237 desde a inoculação até o aparecimento do primeiro sintoma. Vinte três dias após a
238 inoculação foram avaliadas a incidência, que é o percentual de pontos de inoculação
239 com sintomas da doença, e a severidade da doença, estimada medindo-se a extensão das
240 lesões em sentidos diametralmente opostos. Após as avaliações as mudas foram
241 incineradas. O experimento foi realizado duas vezes. Após a realização dos
242 experimentos, as mudas foram incineradas.

243 Visto que não foram observadas diferenças significativas ($P \leq 0,05$) quanto às
244 variâncias das réplicas dos experimentos, os dados foram avaliados como repetições no
245 tempo. Os pressupostos da análise de variância (ANOVA) foram checados pelos testes
246 de Shapiro-Wilk e Levene com auxílio do programa Statistix 9 (Tallahassee, Flórida,
247 Estados Unidos). As médias foram comparadas pelo Teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$) com
248 auxílio do programa SAEG versão 9.0 (Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa,

249 Minas Gerais, Brasil). A relação entre as variáveis estudadas foi analisada por meio do
250 coeficiente de correlação de Pearson, calculado com auxílio do programa Statistix 9.

251

252 **Resultados**

253 **Testes de patogenicidade.** Todos os isolados de *X. campestris* pv. *viticola*
254 utilizados no presente estudo (Tabela 1) foram patogênicos a videira cv. Red Globe e
255 induziram os sintomas característicos da doença.

256 Todas as estirpes foram reisoladas nos meios NYDA e NYDA acrescido com
257 ampicilina (100 mg/l) nos quais as primeiras colônias de *X. campestris* pv. *viticola*
258 surgiram em dois a três dias, e quatro a cinco dias, respectivamente.

259 **Caracterização fenotípica.** Todos os isolados de *X. campestris* pv. *viticola*
260 apresentaram reação Gram negativa, metabolismo aeróbico, crescimento em meio YDC
261 a 33°C, reação positiva para catalase, hidrólise do amido e tween 80 (Tabela 2). Todos
262 os isolados apresentaram reação negativa para formação de colônias amarelas em meio
263 YDC, oxidase, produção de pigmentos fluorescentes, crescimento em meio cloreto de
264 trifetil tetrazolium a 0,1%, hidrólise da ureia e hipersensibilidade em folhas de fumo.
265 Nos testes para detecção da produção de proteases e hipersensibilidade em folhas de
266 tomateiro houve reação variável, com 78,5 e 85,3%, dos isolados apresentando reação
267 positiva, respectivamente.

268 No experimento conduzido em placas de Biolog Gen III, todos os isolados de *X.*
269 *campestris* pv. *viticola* utilizaram ácido L-málico, ácido α -cetoglutárico, D-celobiose,
270 D-frutose, D-galactose, D-manose, L-fucose, N-acetil-D-glicosamina, pectina, sacarose
271 e α -D-glicose como fonte de carbono e cresceram em NaCl 1% e pH 6 (Tabela 2).
272 Nenhum isolado utilizou ácido L-galactônico lactona, ácido N-acetilneuramínico,
273 γ -aminobutírico, D-serina e sorbitol. Nenhum isolado apresentou crescimento em ácido

274 fusídico, bromato de sódio, cloreto de lítio, D-serina, HCl Guanidina, Minociclina,
275 NaCl 8%, Niaproof 4 e telurito de potássio. Nos demais testes bioquímicos houve
276 reação variável com 2,6 a 97,4% dos isolados apresentando reações positivas.

277 Quanto à sensibilidade a antibióticos, todos os isolados de *X. campestris* pv.
278 *viticola* foram sensíveis à cloranfenicol (30µg), eritromicina (15µg), imipenen (10µg) e
279 tetraciclina (30µg) (Tabela 2). Nenhum isolado foi sensível a amoxicilina (30µg),
280 optoquina (5µg), oxacilina (1µg) e trimetropina (5µg). Para os demais antibióticos
281 houve reação variável com 4,3 a 89,7% dos isolados apresentando reações positivas de
282 sensibilidade.

283 A análise de agrupamento realizada com base em 127 características fenotípicas
284 reuniu todos os isolados de *X. campestris* pv. *viticola* em um único grupo com valores
285 acima de 78% de similaridade e valores de 100% de *bootstrap* (Fig. 1). Os níveis de
286 similaridade metabólica entre os isolados de *X. campestris* pv. *viticola* variaram de 77 a
287 97% e todos os isolados foram agrupados separadamente do isolado de *P. syringae* pv.
288 *tomato* ao nível de 72% de similaridade, com valores de 100% de *bootstrap* apoiando o
289 ramo. O nível médio de homogeneidade interna foi de 0,82, indicando baixa
290 heterogeneidade metabólica dentro do grupo de isolados (Tabela 2).

291 Para analisar a variabilidade metabólica intrapatovar, foram definidos 11
292 subgrupos ao nível de 87% de similaridade: subgrupo I, formado por 82,8% dos
293 isolados, incluindo o isolado patótipo IBSBF1967 e os isolados coletados nos estados
294 do Ceará (IBSBF2647), Minas Gerais (UnB1318), Paraná (4779-B) e Roraima
295 (BHV482); subgrupo II, formado pelos isolados UnB1183 e Xcv203; subgrupo III,
296 formado pelos isolados Xcv39, Xcv44, Xcv117, Xcv207 e Xcv214; subgrupo IV,
297 formado pelo isolado Xcv54; subgrupo V, formado pelo isolado ENA4600; subgrupo
298 VI, formado pelos isolados Xcv68, Xcv192, Xcv235 e UnB1309; subgrupo VII,

299 formado pelo isolado Xcv71; subgrupo VIII, formado pelos isolados Xcv38 e Xcv80;
300 subgrupo IX, formado pelos isolados IBSBF2738 e IBSBF2739; subgrupo X, formado
301 pelo isolado Xcv178; e subgrupo XI, formado pelo isolado Xcv33 (Tabelas 1 e 2). O
302 subgrupo X foi o único que apresentou correlação com o local de origem, sendo os dois
303 isolados que compõem este subgrupo oriundos do estado de São Paulo.

304 **Caracterização molecular.** A identificação molecular realizada com os *primers*
305 Xcv1F/Xcv3R permitiu a amplificação de um fragmento de aproximadamente 243 pb
306 (Fig. 2) a partir do DNA de todos os isolados de *X. campestris* pv. *viticola*. Nenhum
307 fragmento foi amplificado a partir do DNA do isolado PST, o qual foi incluído na
308 análise como controle positivo.

309 A amplificação do DNA genômico dos 117 isolados por meio da técnica de rep-
310 PCR gerou um total de 45 bandas reprodutíveis variando de 100 a 3000 pb, sendo
311 observadas 14, 17 e 14 bandas com os *primers* REP, ERIC e BOX, respectivamente
312 (Fig. 3). A análise de agrupamento realizada com base nos dados de REP, ERIC e BOX
313 isoladamente (Figs. suplementares 1, 2 e 3) demonstrou a existência de alta similaridade
314 entre os isolados de *X. campestris* pv. *viticola*, permitindo o agrupamento de todos os
315 isolados aos níveis de 90, 75 e 83% de similaridade e a identificação de 10, 42 e 39
316 haplótipos com cada um dos três *primers*, respectivamente.

317 A análise de agrupamento realizada com os dados de REP, ERIC e BOX
318 combinados linearmente (rep-PCR) permitiu a formação de um único grupo abrigando
319 todos os isolados de *X. campestris* pv. *viticola* ao nível de 88% de similaridade e valores
320 de 100% de *bootstrap* (Fig. 4). Os níveis de similaridade genética entre os isolados de
321 *X. campestris* pv. *viticola* variaram de 88 a 100%, sendo identificados dois grupos com
322 valores de *bootstrap* de 100% apoiando o ramo. Foram identificados 113 haplótipos: um
323 haplótipo com três isolados (ENA4560, UnB1304 e ENA4598), um haplótipo com dois

324 isolados (Xcv104 e Xcv89) e 111 haplótipos, sendo cada um deles com um isolado.
325 Todos os isolados de *X. campestris* pv. *viticola* foram agrupados separadamente do
326 isolado de *P. syringae* pv. *tomato* a partir de 54% de similaridade, com valores de 100%
327 de *bootstrap*.

328 Para analisar a variabilidade genética intrapatovar, foram definidos sete
329 subgrupos ao nível de 91% de similaridade: subgrupo I, formado por 81% dos isolados,
330 incluindo o isolado patótipo IBSBF1967 e os isolados coletados nos estados do Ceará
331 (IBSBF2647), Minas Gerais (UnB1318), Paraná (4779-B), Roraima (BHV482) e São
332 Paulo (IBSBF2738 e IBSBF2739); subgrupo II, formado pelos isolados Xcv13, Xcv52,
333 Xcv178 e Xcv208; subgrupo III, formado pelos isolados Xcv225, Xcv79, Xcv116,
334 Xcv156 e Xcv206 ; subgrupo IV, formado pelos isolados Xcv229, Xcv232, Xcv228 e
335 Xcv205; subgrupo V, formado pelos isolados Xcv142 e Xcv38; subgrupo VI, formado
336 pelo isolado Xcv55; e subgrupo VII, formado pelos isolados Xcv171, Xcv39, Xcv5,
337 Xcv8, Xcv117 e Xcv68 (Fig. 4; Tabela 1). Não foram identificadas relações dos
338 subgrupos de rep-PCR com o ano, origem, órgão ou cultivar em que os isolados foram
339 obtidos.

340 **Caracterização epidemiológica.** A análise de agrupamento realizada com os
341 dados epidemiológicos permitiu a identificação de seis grupos (A – F) com base no
342 período de incubação: grupo A, composto por apenas um isolado e período de
343 incubação de 10,3 dias; grupo B, composto por um isolado e período de incubação de
344 8,0 dias; grupo C, composto por cinco isolados e período de incubação variando de 6,4 a
345 7,2 dias; grupo D, composto por cinco isolados e período de incubação variando de 5,3
346 a 5,6 dias; grupo E, composto por 37 isolados e período de incubação variando de 3,9 a
347 5,0 dias; e grupo F, composto por 67 isolados e período de incubação variando de 2,5 a
348 3,8 dias (Tabela 1).

349 Foram identificados quatro grupos (A – B) com base nos dados da severidade:
350 grupo A, composto por 49 isolados e severidade variando de 4,7 a 5,4 mm; grupo B,
351 composto por 57 isolados e severidade variando de 4,0 a 4,6 mm; grupo C, composto
352 por oito isolados e severidade variando de 3,4 a 3,9 mm; e grupo D, composto por dois
353 isolados e severidades de 2,2 e 2,6 mm (Tabela 1). Todos os isolados do grupo A
354 identificados com base nos dados da severidade foram agrupados nos grupos E e F
355 identificados com base no período de incubação, exceto o isolado Xcv143, o qual foi
356 abrigado no grupo D.

357 Isolados com alta agressividade foram abrigados no grupo A da severidade e
358 grupos E e F do período de incubação (exceto Xcv143, o qual foi abrigado no grupo D);
359 isolados apresentando agressividade intermediária foram abrigados no grupo B da
360 severidade e grupos C, D, E e F do período de incubação; e, isolados com baixa
361 agressividade foram agrupados nos grupos C e D da severidade e em todos os grupos do
362 período de incubação.

363 Não foram observadas diferenças significativas ($P \leq 0,05$) quanto à incidência da
364 doença provocada pela inoculação artificial em folhas de videira cv. Red Globe, sendo
365 observados valores superiores a 95% para todos os isolados (dados não apresentados).
366 Foi observada correlação positiva entre a incidência e a severidade da doença ($r = 0,6$;
367 $P \leq 0,05$) e correlações negativas entre a severidade e o período de incubação ($r = - 0,6$;
368 $P \leq 0,05$) e entre a incidência e o período de incubação ($r = - 0,9$; $P \leq 0,05$).

369

370 **Discussão**

371 Para avaliar a estrutura populacional de isolados brasileiros de *X. campestris* pv.
372 *viticola*, uma coleção de 115 isolados coletados desde a primeira ocorrência do cancro
373 bacteriano da videira no país, em 1998, até o ano de 2012 (Tabela 1), foi estudada com

374 abordagem polifásica. A grande maioria dos isolados ($\pm 95\%$) foi coletada em diferentes
375 parreirais do Vale do Submédio São Francisco, onde o cancro bacteriano da videira é
376 fator limitante da produção e o agente causal é considerado praga quarentenária presente
377 (A2) (Instrução Normativa Nº 59/2007), com programa oficial de controle estabelecido
378 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (BRASIL,
379 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2008).
380 Também foram incluídos isolados coletados nos estados do Ceará (IBSBF2647), Minas
381 Gerais (UnB1318), Paraná (4779-B), Roraima (BHV482) e São Paulo (IBSBF2738 e
382 IBSBF2739), onde a doença foi introduzida e, posteriormente, erradicada (FREIRE;
383 OLIVEIRA, 2001; HALFELD-VIEIRA; NECHET, 2006; JUNQUEIRA et al., 2006;
384 RODRIGUES NETO et al., 2011; TOMAZ et al., 2011). No entanto, não foi possível
385 incluir nenhum isolado dos estados de Goiás e Piauí, onde a doença também foi
386 introduzida e erradicada, pelo fato de não existirem isolados disponíveis nas coleções
387 consultadas. Visto que a introdução do cancro bacteriano no Brasil foi realizada por
388 meio de bacelos contaminados provenientes da Índia (FREIRE; OLIVEIRA, 2001;
389 RODRIGUES NETO et al., 2011; TRINDADE et al., 2005), o isolado patótipo de *X.*
390 *campestris* pv. *viticola* (IBSBF1976) oriundo da Índia também foi incluído nas análises
391 para avaliar o nível do relacionamento entre este isolado e os isolados brasileiros.

392 Antes da execução dos experimentos conduzidos neste estudo, testes de
393 patogenicidade foram realizados em videiras cv. Red Globe para assegurar a viabilidade
394 patogênica dos 116 isolados de *X. campestris* pv. *viticola*. Esta cultivar foi selecionada
395 para execução dos experimentos pela alta suscetibilidade ao cancro bacteriano da
396 videira (MALAVOLTA JR. et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2006). O cumprimento
397 dos postulados de Koch para todos os isolados comprovaram a patogenicidade dos
398 isolados. Inicialmente, os reisolamentos foram realizados em meio NYDA acrescido de

399 ampicilina (100 mg/l) para evitar o crescimento de microrganismos saprofiticos. No
400 entanto, o acrescimo de ampicilina ao meio atrasou o surgimento das primeiras colônias
401 cerca de dois a três dias em relação ao meio NYDA sem ampicilina. Conforme descrito
402 anteriormente (PEIXOTO et al., 2006), o acrescimo de ampicilina ao meio também
403 provocou uma diminuicao no tamanho das colônias de *X. campestris* pv. *viticola*, o que
404 dificultou a identificacao das mesmas. Por outro lado, poucos microrganismos
405 saprofiticos cresceram a partir dos reisolamentos realizados em meio NYDA sem
406 ampicilina, o que facilitou a identificacao das colônias de *X. campestris* pv. *viticola*
407 nestas condicoes.

408 A caracterizacao fenotipica preliminar dos 116 isolados de *X. campestris* pv.
409 *viticola* foi realizada com base em 14 testes bioquimico-fisiologicos convencionais
410 utilizados para identificacao de generos de bacterias fitopatogênicas (SCHAAD et al.,
411 2001). Com excecao dos testes para formacao de colônias amarelas em meio YDC,
412 producao de proteases e hipersensibilidade em folhas de tomateiro, os demais testes
413 utilizados permitiram a identificacao de todos os isolados no genero *Xanthomonas*
414 (Tabela 2). *X. campestris* pv. *viticola*, assim como outras especies e patovares de
415 *Xanthomonas* (AH-YOU et al., 2007; GAMA et al., 2011), não produz xantomadina,
416 apresentando colônias de coloracao creme a esbranquiçada em meio de cultura YDC e
417 em outros meios, conforme já descrito (MALAVOLTA JR. et al., 1999; NAYUDU,
418 1972; PEIXOTO et al., 2006; TRINDADE et al., 2005; TRINDADE et al., 2007). Em
419 estudos anteriores isolados indianos apresentaram reacao negativa para producao de
420 proteases (ARAÚJO, 2001; CHAND; KISHUN, 1990) enquanto isolados brasileiros
421 apresentaram reacao positiva (ARAÚJO, 2001; TRINDADE et al., 2005). No presente
422 estudo foi confirmada a ausencia de producao de proteases para o isolado indiano
423 (IBSBF1967) e houve variabilidade entre os isolados brasileiros, sendo que 21 deles

424 apresentaram reação negativa. Isolados brasileiros de *X. campestris* pv. *viticola* têm
425 apresentado hipersensibilidade positiva em folhas de tomateiro (MALAVOLTA JR et
426 al. 1999), entretanto neste estudo foi verificada reação variável, com 24 isolados
427 apresentando reação negativa. Tanto a capacidade de causar reação de
428 hipersensibilidade quanto à de causar doença são governadas por genes *hrp*
429 (BÜTTNER; HE, 2009; LINDGREN, 1998). Portanto, esses resultados sugerem que
430 podem existir alterações consistentes neste conjunto de genes.

431 No experimento realizado com microplacas Biolog GenIII, entre os 94 testes
432 disponíveis 27 apresentaram elevado poder discriminatório, sendo observadas 13
433 reações positivas e 14 negativas, para todos os isolados (Tabela 2). Quando o
434 experimento foi repetido com 50 isolados selecionados ao acaso, os quais apresentaram
435 o mesmo perfil metabólico obtido no primeiro experimento, ficou comprovada a
436 elevada reprodutibilidade desta técnica. Similarmente, dos 20 antibióticos comerciais
437 testados, oito apresentaram elevado poder discriminatório, sendo verificadas quatro
438 reações positivas e quatro negativas (Tabela 2). No total, foram identificados 48 testes
439 bioquímico-fisiológicos com potencial para serem inseridos em caracterizações
440 envolvendo isolados de *X. campestris* pv. *viticola*.

441 A análise de agrupamento realizada com as 127 características fenotípicas
442 agrupou todos os isolados de *X. campestris* pv. *viticola* com percentuais de 77 a 97% de
443 similaridade (Fig. 1), indicando baixa variabilidade metabólica. Para analisar a
444 consistência dos perfis metabólicos desses isolados, foi calculado o nível médio de
445 homogeneidade interna (*h*), utilizado anteriormente (VAUTERIN et al., 1995) para
446 caracterizar a heterogeneidade metabólica existente entre grupos de *Xanthomonas* spp.
447 identificados por homologia de DNA, sendo heterogêneos os grupos apresentando
448 valores abaixo de 0,75. O valor de *h* do grupo de isolados de *X. campestris* pv. *viticola*

449 foi de 0,82 (Tabela 2), indicando consistência nos perfis gerados e, conseqüentemente,
450 baixa heterogeneidade metabólica, concordando com as análises de agrupamento.

451 Para investigar a variabilidade metabólica intrapatovar e a existência de
452 possíveis correlações entre os isolados de *X. campestris* pv. *viticola* e o ano, origem
453 geográfica, órgão e cultivar de onde eles foram obtidos, 11 subgrupos foram definidos
454 ao nível de 87% de similaridade, sendo observada correlação apenas entre os isolados
455 do subgrupo X (IBSBF2738 e IBSBF2739) e a origem geográfica (São Paulo). No
456 entanto, o baixo valor de *bootstrap* (41%) demonstrou baixa confiabilidade deste ramo,
457 não apoiando esta correlação. Visto que a introdução do cancro bacteriano da videira no
458 estado de São Paulo foi ocasionada por meio de material propagativo contaminado
459 proveniente do Vale do Submédio São Francisco (RODRIGUES NETO et al., 2011), é
460 possível que esta correlação se deva à recente introdução do cancro bacteriano da
461 videira em São Paulo, o que poderia ter ocasionado um maior estreitamento metabólico
462 entre os isolados que compõem o subgrupo IX devido as condições climáticas deste
463 estado, as quais são completamente distintas do clima semiárido do Vale do Submédio
464 São Francisco.

465 Apesar da variabilidade observada entre os isolados de *X. campestris* pv. *viticola*
466 quanto a reação de hipersensibilidade em folhas de tomateiro, foi verificada a
467 amplificação de um fragmento de aproximadamente 243 pb do gene *hrpB* a partir do
468 DNA todos os isolados de *X. campestris* pv. *viticola* incluídos neste estudo. Portanto,
469 uma vez que os genes *hrp* são comumente organizados em um grande grupo de genes
470 consistindo de múltiplas unidades transcricionais (KADO, 2010; LINDGREN, 1998), é
471 provável que o gene *hrpB* não esteja envolvido com a resposta desta reação em folhas
472 de tomateiro. No entanto, estudos mais aprofundados serão necessários para comprovar
473 esta hipótese.

474 A estrutura genética dos 116 isolados de *X. campestris* pv. *viticola* foi analisada
475 pela técnica de rep-PCR, a qual também foi utilizada para caracterização da
476 variabilidade genética de *Xanthomonas* spp. (GAMA et al., 2011; LOUWS et al., 1994;
477 MARQUES, 2007; RADEMAKER et al., 2000; RADEMAKER et al., 2005;
478 TRINDADE; et al 2005). A análise de UPGMA realizada com base nos dados de rep-
479 PCR agrupou todos os isolados de *X. campestris* pv. *viticola* ao nível de 88% de
480 similaridade e valor de 100% de *bootstrap*, demonstrando a elevada confiabilidade do
481 ramo (Fig. 4). Dois subgrupos foram identificados ao nível de 87% de similaridade e
482 valores de 100% de *bootstrap* apoiando o ramo, sugerindo a formação de duas linhas
483 evolucionárias. Além disso, teoricamente, os baixos valores de *bootstrap* observados
484 nos ramos internos dos dois subgrupos indicaram a existência de fluxo gênico entre os
485 isolados de *X. campestris* pv. *viticola* (i.e. por meio de transferência horizontal).

486 Eventos de transferência genética horizontal, detectados em diversas espécies e
487 patovares de *Xanthomonas*, podem gerar perturbações genômicas ao ponto de dificultar
488 interpretações taxonômicas para alguns táxons (YOUNG, 2008). Em *X. oryzae* pv.
489 *oryzae*, que coloniza os vasos xilemáticos do arroz, múltiplos eventos de transferência
490 horizontal ocorreram no locus *lps* ao longo do tempo, gerando alta variabilidade
491 genética entre isolados (PRABHU; SONTI, 2004). Visto que *X. campestris* pv. *viticola*
492 também é um patógeno que ataca o sistema vascular (ARAUJO, 2001), a troca de
493 material genético poderia facilmente ocorrer neste ambiente. Portanto, a geração de
494 variabilidade aliada à interação com videiras apresentando diferentes níveis de
495 resistência justificaria a formação das duas linhas evolucionárias observadas neste
496 estudo. Análises de redes de haplótipos poderiam comprovar esta hipótese.

497 Com base na matriz de similaridade (dados não apresentados), foram
498 identificados 113 haplótipos: um haplótipo abrigando os isolados ENA4560, UnB1304

499 e ENA4598, coletados no município Petrolina (PE) nos anos de 1999, 2005 e 2010,
500 respectivamente; um haplótipo abrigando os isolados Xcv104 e Xcv89, coletados nos
501 municípios de Casa Nova (BA) e Juazeiro (BA) nos anos de 1999 e 2000,
502 respectivamente; e 111 haplótipos, cada um deles com um isolado, indicando que apesar
503 da elevada similaridade entre os isolados, a variabilidade intrapatovar deste táxon não
504 deve ser negligenciada. Ficou demonstrado, portanto, a elevada eficiência da técnica de
505 rep-PCR para identificação e monitoramento da variabilidade genética de *X. campestris*
506 pv. *viticola*, conforme descrito anteriormente (TRINDADE et al., 2005).

507 Para investigar a variabilidade genética intrapatovar a existência de possíveis
508 correlações entre os isolados de *X. campestris* pv. *viticola* e o ano, origem geográfica,
509 órgão e cultivar de onde foram obtidos, sete subgrupos foram definidos ao nível de 91%
510 de similaridade com base nos dados de rep-PCR (Fig. 4). No entanto, nenhuma
511 correlação foi verificada, concordando com resultados obtidos em outros estudos
512 (MARQUES et al., 2007; TRINDADE et al., 2005). A ausência de correlações pode ser
513 explicada pelo fato da doença ter sido introduzida recentemente no Brasil, não tendo
514 havido tempo suficiente para que segregações genômicas gerassem especiações ao
515 ponto de serem detectadas com as ferramentas descritas neste estudo.

516 Os isolados de *X. campestris* pv. *viticola* oriundos dos estados do Ceará
517 (IBSBF2647), Minas Gerais (UnB1318), Paraná (4779-B), Roraima (BHV482), São
518 Paulo (IBSBF2738 e IBSBF2739), da Índia (isolado patótipo IBSBF1967) e 87 isolados
519 coletados no Vale do Submédio São Francisco foram abrigados no grupo I com mais de
520 91% de similaridade (Fig. 4). Considerando que a introdução do cancro bacteriano da
521 videira nos estados de Roraima (HALFELD-VIEIRA; NECHET, 2006) e São Paulo
522 (RODRIGUES NETO et al., 2011) foi ocasionada pela implantação de parreirais com
523 material propagativo proveniente de Petrolina (PE) e que foi observada elevada

524 similaridade entre os isolados coletados nesses estados e isolados coletados no Vale do
525 Submédio São Francisco, é provável que introdução da doença nos estados do Ceará,
526 Minas Gerais e Paraná também tenha ocorrido via material propagativo contaminado
527 oriundo do Vale do Submédio São Francisco,

528 Análises realizadas por meio de rep-PCR indicaram a existência de variabilidade
529 genômica entre 40 isolados de *X. campestris* pv. *viticola* coletados nos estados de
530 Pernambuco, Bahia e Piauí de 1998 (ano de introdução da doença no Brasil) a 2001,
531 sendo reportada a formação de um grupo a 44% e cinco subgrupos ao nível de 68% de
532 similaridade (TRINDADE et al., 2005). Posteriormente, a análise de rep-PCR realizada
533 com 27 isolados de *X. campestris* pv. *viticola* coletados de 2003 a 2006 nos estados da
534 Bahia, Pernambuco e Minas Gerais revelou a formação de um único grupo a 70% de
535 similaridade, sendo sugerido que poderia ter havido uma possível estabilização da
536 variação genômica inicialmente identificada entre os 40 isolados coletados de 1998 a
537 2001 (MARQUES et al., 2007). No presente estudo, o agrupamento de todos os isolados
538 de *X. campestris* pv. *viticola* utilizados ao nível de 88% de similaridade reforça esta
539 hipótese.

540 Todos os isolados abrigados nos grupos II a VII (definidos ao nível de 91% de
541 similaridade) foram obtidos a partir de 2008, indicando que a variabilidade intrapatovar
542 observada entre os isolados de *X. campestris* pv. *viticola* possivelmente surgiu
543 recentemente e não reflete a variabilidade detectada entre os isolados coletados de 1998
544 a 2001 (TRINDADE et al., 2005). Considerando que o filoplano é um ambiente hostil
545 pelo fato das fitobactérias estarem expostas à dessecação e à radiação ultravioleta dos
546 raios solares (KADO, 2010), o clima semiárido do Vale do Submédio São Francisco
547 pode ter exercido uma pressão de seleção ao ponto de eliminar isolados com baixa
548 adaptabilidade a este ambiente. Portanto, a variabilidade inicialmente identificada entre

549 os 40 isolados coletados de 1998 a 2001 (TRINDADE et al., 2005) pode ter sido reflexo
550 da variabilidade originalmente introduzida no Brasil.

551 Apesar das diferenças observadas entre os níveis de similaridade nos quais os
552 grupos e subgrupos foram identificados na população de 40 isolados de *X. campestris*
553 pv. *viticola* coletados de 1998 a 2001 (TRINDADE et al., 2005) e neste estudo, esses
554 resultados indicaram claramente a ocorrência de um grupo homogêneo formado pela
555 grande maioria dos isolados de *X. campestris* pv. *viticola* e poucos isolados divergindo
556 geneticamente deste grupo. Dos cinco subgrupos observados inicialmente entre os 40
557 isolados coletados de 1998 a 2001 (TRINDADE et al., 2005), um subgrupo abrigou
558 78% dos isolados e os outros quatro subgrupos abrigaram os demais isolados (um
559 subgrupo com quatro, dois subgrupos com dois e um subgrupo com um isolado). Neste
560 estudo, dos sete subgrupos formados ao nível de 91% de similaridade, um subgrupo
561 abrigou 81% dos isolados (incluindo o isolado patótipo IBSBF1967 oriundo da Índia),
562 com os demais isolados sendo abrigados nos outros seis subgrupos (um subgrupo com
563 seis, um subgrupo com cinco, dois subgrupos com quatro, um subgrupo com dois e um
564 subgrupo com um isolado). Portanto, é possível que após a estabilização da
565 variabilidade genômica inicial introduzida no Vale do Submédio São Francisco, um
566 novo processo de divergência esteja ocorrendo, causado talvez, pela substituição de
567 parreirais formados pela cv. Red Globe, a qual é altamente suscetível ao cancro
568 bacteriano, por cultivares com maiores níveis de resistência (MARQUES et al., 2007).

569 O período de incubação e a severidade da doença constituem importantes
570 instrumentos comparativos e analíticos da intensidade de doenças, indicando a
571 velocidade com que o patógeno coloniza o hospedeiro e a intensidade da doença,
572 respectivamente (CAMPBELL; MADDEN, 1990). Esses e outros componentes
573 epidemiológicos (índice de doença, taxa de progresso da doença e área abaixo da curva

574 de progresso da doença) foram utilizados para estudar a reação de clones de videira
575 quanto à resistência a *X. campestris* pv. *viticola*, sendo observadas correlações
576 significativas entre as variáveis estudadas, indicando que qualquer uma delas pode ser
577 utilizada em pesquisas envolvendo reação de clones ao cancro bacteriano da videira
578 (NASCIMENTO et al., 2006). Neste estudo, o período de incubação e a severidade da
579 doença provocada pela inoculação artificial dos 116 isolados em videiras cv. Red Globe,
580 utilizados para caracterizar a variabilidade epidemiológica de *X. campestris* pv. *viticola*,
581 permitiram a caracterização de isolados com alta, intermediária e baixa agressividade, o
582 que será importante para estudos visando a obtenção de variedades resistentes ao cancro
583 bacteriano. Adicionalmente, correlações negativas observadas entre a severidade e o
584 período de incubação indicaram uma tendência para diminuição do período de
585 incubação e aumento da severidade da doença, ou vice-versa, conforme observado em
586 estudos anteriores (NASCIMENTO et al., 2006).

587 Em conclusão, os isolados brasileiros de *X. campestris* pv. *viticola* formaram um
588 grupo homogêneo composto por duas linhas evolucionárias e elevada variabilidade
589 intrapatovar. Estas características dos isolados brasileiros de *X. campestris* pv. *viticola*
590 deverão estudadas de forma mais aprofundada e com ferramentas e marcadores
591 moleculares mais robustos. Além disso, foi determinado um conjunto de características
592 metabólicas, moleculares e epidemiológicas que permitirão a seleção de isolados
593 representativos da variabilidade dessa fitobactéria para estudos visando o
594 esclarecimento dos mecanismos moleculares da interação bactéria planta, bem como
595 para obtenção de cultivares resistentes ao cancro bacteriano.

596

597

598

599 **Agradecimentos**

600 A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
601 (FACEPE), pela bolsa de Doutorado concedida a M. A. S. Gama e ao Conselho
602 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de
603 produtividade aos pesquisadores E. B. Souza e R. L. R. Mariano. Aos Drs. J. S. P.
604 Araújo, Instituto de Agronomia-UFRRJ e D. A. Schurt, Embrapa Roraima.

605

606 **Literatura Citada**

- 607 1. Ah-You, N., Gagnevin, L., CHIROLEU, F., JUEN, E., Rodrigues Neto, J. e
608 Pruvost, O. 2007. Pathological variations within *Xanthomonas campestris* pv.
609 *maniferaeindicae* supported its separation into three distinct pathovars that can
610 be distinguished by amplified fragment length polymorphism. *Phytopathology*
611 97: 1568-1577.
- 612 2. Ah-You, N.; Gagnevin, L.; Grimont, P. A. D.; Brisse, S.; Nesme, X.; Chiroleu,
613 F.; Bui Thi Ngoc, L.; Juen, E.; Lefeuvre, P.; Vernière, C. e Pruvost, O. 2009.
614 Polyphasic characterization of xanthomonads pathogenic to members of the
615 Anacardiaceae and their relatedness to species of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst.*
616 *Evol. Microbiol.* 59: 306-318.
- 617 3. Araujo, J. S. P. 2001. Perfil epidemiológico e subsídios para o controle de
618 *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, agente do cancro
619 bacteriano da videira (*Vitis vinifera*) no Brasil. 2001. Ph.D. Tese, Universidade
620 Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- 621 4. Araujo, J. S. P., Reis Júnior, F. B., Cruz, G. B., Oliveira, B. C., Robbs, C. F.,
622 Ribeiro, R. L. D. e Polidoro, J. C. 2005. Produção e caracterização de anticorpos

- 623 policlonais contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Pesq. Agropec. Bras.*
624 40: 305-309.
- 625 5. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de
626 Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 20 de 27 de setembro de 2001.
627 Aprova as diretrizes para a produção integrada de frutas – DGPIF e as normas
628 técnicas gerais para a produção integrada de frutas. Acesso em 03 de novembro
629 de 2009 em
630 [http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operac](http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=3915)
631 [ao=visualizar&id=3915](http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=3915).
- 632 6. Buensanteai, M. N. Identification, development of detection method and survey
633 of bacterial necrosis disease of grapevine in Thailand. 2004. Ds.C. Dissertação,
634 Suranaree University of Technology, Muang District.
- 635 7. Bull, C. T., De Boer, S. H., Denny, T. P., Firrao, G., Fischer-Le Saux, M.,
636 Saddler, G. S., Scortichini, M., Stead, D. E. e Takikawa, Y. 2010.
637 Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980-2007. *J. Plant*
638 *Pathol.* 92: 551-592.
- 639 8. Büttner, D. e He, S. Y. 2009. Type III Protein Secretion in Plant Pathogenic
640 Bacteria. *Plant Physiol.* 150: 1656–1664.
- 641 9. Campbell, C. L. e Madden, L. V. 1990. Introduction to plant disease
642 epidemiology. John Wiley & Sons, New York.
- 643 10. Chand, R., Kishun, R. 1990. Outbreak of grapevine bacterial canker disease in
644 India. *Vitis* 29: 183-188.
- 645 11. Costa, V. S. O., Mariano, R. L. R. e Michereff, S. J. 2001. Variabilidade de
646 isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* no estado de Pernambuco.
647 *Summa Phytopathol.* 24: 182-189.

- 648 12. Ferreira-Tonin, M. Caracterização taxonômica de espécies do gênero
649 *Xanthomonas*. 2012. Ph.D. Tese, Universidade Estadual de Campinas,
650 Campinas, São Paulo.
- 651 13. Ferreira-Tonin, M., Corrêa, D. B. A. e Destéfano, S. A. L. 2011. Classificação
652 de linhagens de *Xanthomonas* sp. por multilocus seuqence analysis (MLSA) e
653 Hibridização DNA-DNA. Trop. Plant Pathol. 36: 128.
- 654 14. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. Roma.
655 Acesso em 02 de janeiro de 2014 em [http://faostat3.fao.org/faostat-](http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/T/TP/E)
656 [gateway/go/to/download/T/TP/E](http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/T/TP/E).
- 657 15. Freire, F. C. O. e Oliveira, A. D. S. 2001. Ocorrência do cancro bacteriano da
658 videira no estado do Ceará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária,
659 Fortaleza, Comunicado Técnico No 62.
- 660 16. Gama, M. A. S., Mariano, R. L. R., Viana, F. M. P., Ferreira, M. A. S. V. e
661 Souza, E. B. 2011. Polyphasic characterization of pigmented strains of
662 *Xanthomonas* pathogenic to cashew trees. Plant Dis. 95: 793-802.
- 663 17. Halfeld-Vieira, B. A. e Nechet, L. K. 2006. Bacterial canker of grapevine in
664 Roraima, Brazil. Fitopatol. Bras. 31: 604.
- 665 18. Hampl, V., Pavlicek, A. e Flegr, J. 2001. Construction and bootstrap analysis of
666 DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program
667 FreeTree: application to trichomonad parasites. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:
668 731-735.
- 669 19. Hauben, L., Vauterin, L., Swings, J. e Moore, E. R. B. 1997. Comparison of 16S
670 ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. Int. J. Syst. Bacteriol.
671 57: 328-335.

- 672 20. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. SIDRA. Rio de Janeiro. Acesso
673 em 11 de novembro de 2013 em
674 <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1613&z=p&o=18&i=P>.
- 675 21. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasil. Instrução
676 Normativa Nº 59 de 20 de dezembro de 2007. Acesso em 27 de dezembro de
677 2013 em
678 http://www.cidasc.sc.gov.br/defesasanitariavegetal/files/2012/08/Instru%C3%A7%C3%A3o_Normativa_59_pragas_presentes_A2.htm.
- 680 22. Junqueira, N. T. V., Junqueira, K. P., Braga, M. F., Vaz, C. F., Santos, E. C.,
681 Junqueira, L. P., Souza, L. S. e Lima, C. A. Ocorrência do cancro bacteriano da
682 videira na região do entorno do Distrito Federal. In: Congresso Brasileiro de
683 Fruticultura, XIX, 2006, Cabo Frio. Abstracts... Rio de Janeiro,
684 SBF/UENF/UFRRJ.
- 685 23. Kado, C. I. 2010. Plant Bacteriology. APS Press, St Paul, MN.
- 686 24. Kochenko, Z. I. Development of canker tumours on grape roots. 1993.
687 Zashchita-Rastenii 7: 42-43.
- 688 25. Lazzarotto, J. J. e Fioravanço, J. C. 2013. Tendências e sazonalidades nas
689 exportações e importações brasileiras de uva de mesa. Inf. Econ. 43: 43-58.
- 690 26. Lima, M. F., Ferreira, M. A. S. V., Moreira, W. A. e Dianese, J. C. 1999.
691 Bacterial canker of grapevine in Brazil. Fitopatol. Bras. 24: 440-443.
- 692 27. Lindgren, P. B. 1997. The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions.
693 Annu. Rev. Phytopathol. 35: 129–152.
- 694 28. Louws, E. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T. e Bruijn, F. J. 1994. Specific
695 genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas*

- 696 pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. Appl. and
697 Environ. Microbiol. 60: 2286-2295.
- 698 29. Malavolta Jr., V. A., Almeida, I. M. G., Sugimori, M. H., Ribeiro, I. J. A,
699 Rodrigues Neto, J., Pires, E. J. P. e Nogueira, E. M. C. 1999. Ocorrência de
700 *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videira no Brasil. Summa Phytopathol.
701 25: 26-27.
- 702 30. Malavolta JR., V. A., Sugimori, M. H., Almeida, I. M. G. e Ribeiro, I. J. A 2003.
703 Resistência de variedades de videira a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*.
704 Arq. Inst. Biol. 70: 373-376.
- 705 31. Marques, E. 2007. Variabilidade e tolerância ao cobre em *Xanthomonas*
706 *campestris* pv. *viticola* agente causal do cancro bacteriano da videira *Vitis* spp.
707 Ms.C. Dissertação, Universidade de Brasília, Brasília.
- 708 32. Nascimento, A. R. P. e Mariano, R. L. R. 2004. Cancro bacteriano da videira:
709 etiologia, epidemiologia e medidas de controle. Cienc. Rural 34: 301-307.
- 710 33. Nascimento, A. R. P., Michereff, S. J., Mariano, R. L. R. e Viana, I. O. 2006.
711 Reação de clones de videira a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, baseada nos
712 componentes epidemiológicos do cancro bacteriano. Cienc. Rural 36: 1-7.
- 713 34. Nayudu, M. V. 1972. *Pseudomonas viticola* sp. nov., incitant of a new bacterial
714 disease of grapevine. Phytopathol. Z. 73: 183-186.
- 715 35. Pavlicek, A., Hrdá, S. e Flegr, J. 1999. FreeTree – freeware program for
716 construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and
717 bootstrap/jackknife analysis of the robustness. Application in the RAPD analysis
718 of genus *Frekelia*. Folia Biol. 45: 97-99.

- 719 36. Peixoto, A. R., Mariano, R. L. R. e Viana, I. O. 2006. Meio semi-seletivo para
720 isolamento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. Cienc. Rural 36: 1317-
721 1320.
- 722 37. Prabhu, B. P. e Sonti, R. 2004. Variation suggestive of horizontal gene transfer
723 at a lipopolysaccharide (lps) biosynthetic locus in *Xanthomonas oryzae* pv.
724 *oryzae*, the bacterial leaf blight pathogen of rice. BMC Microbiol. 4 :1-14.
- 725 38. Rademaker, J. L. W., Hoste, B., Louws, F. J., Kersters, K., Swings, J., Vauterin,
726 L., Vauterin, P. e Bruijn, F. L. 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR
727 genomic fingerprinting with DNA- DNA homology studies: *Xanthomonas* as a
728 model system. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 665-677.
- 729 39. Rademaker, J. L. W., Louws, F. J., Schultz, M. H., Rossbach, U., Vauterin, L.,
730 Swings,, J. e Bruijn, F. J. 2005. A comprehensive species to strain taxonomic
731 framework for *Xanthomonas*. Phytopathology 95: 1098-1111.
- 732 40. Rodrigues Neto, J., Destéfano, S. A. L., Rodrigues, L. M. R., Pelloso, D. S. e
733 Oliveira Júnior, L. C. 2011. Grapevine bacterial canker in the state of São Paulo,
734 Brazil: detection and eradication. Trop. Plant Pathol. 36: 42-44.
- 735 41. Schaad, N. W., Jones, J. B. e Chun, W. 2001. Laboratory guide for identification
736 of plant pathogenic bacteria. 3rd ed. APS Press, St Paul, MN.
- 737 42. Takita, M. A., Borges, K. M., Reis, M. S. e Destéfano, S. A. L. Analysis of
738 genomic sequences of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* gives support to a
739 taxonomic reclassification. In: Reunião Annual da Sociedade Brasileira de
740 Bioquímica e Biologia Molecular, XXXV, 2006, Águas de Lindóia. Abstracts...
741 São Paulo, Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular.

- 742 43. Tomaz, R., Scremin, R. M., Ferreira, M. A. S. V. e Barbosa, M. A. G. 2011.
743 Detecção e erradicação de videiras com sintomas do cancro bacteriano no
744 Estado do Paraná. Trop. Plant Pathol. 36: 896.
- 745 44. Trindade, L. C., Lima, M. F. e Ferreira, M. A. S. V. 2005. Molecular
746 characterization of Brazilian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* by
747 rep-PCR fingerprinting. Fitopatol. Bras. 30: 46-54.
- 748 45. Trindade, L. C., Marques, E., Lopes, D. B. e Ferreira, M. A. S. V. 2007.
749 Development of a molecular method for detection and identification of
750 *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. Summa Phytopathol. 33: 16-23.
- 751 46. Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K. e Swings, J. 1995. Reclassification of
752 *Xanthomonas*. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 472-489.
- 753 47. Young, J. M. 2008. An overview of bacterial nomenclature with special
754 reference to plant pathogens. Syst. Appl. Microbiol. 31: 405–424.
- 755 48. Young, J. M., Park, D. C., Shearman, H. M. e Fargier, E. 2008. A multilocus
756 sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. Syst. Appl. Microbiol. 31: 366-
757 377.

Tabela 1. Características dos isolados brasileiros de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* analisadas neste estudo

Código ^s	Ano de isolamento	Origem	Órgão	Cultivar	Grupo metabólico ^t	Grupo genômico ^u	Período de	
							Incubação (dias) ^v	Severidade (mm) ^w
IBSBF1967	1972	Índia	ND ^x	Anab-e-Shahi	I	I	4,6 e ^y	4,3 b
UnB 1191	1998	Petrolina/PE	Folha	Itália	I	I	3,5 f	4,8 a
UnB 1183	1998	Petrolina/PE	Folhas	Red Globe	II	I	4,1 e	4,5 b
IBSBF1506	1999	Petrolina/PE	ND	ND	I	I	3,0 f	4,5 b
UnB 1205	2000	Sobradinho/BA	Folhas	Itália	I	I	10,3 a	3,9 c
UnB 1299	2004	Juazeiro/BA	Folhas	Thompson	I	I	7,2 c	2,6 d
UnB 1315	2005	Petrolina/PE	Nervuras	Red Globe	I	I	5,3 d	4,5 b
UnB 1314	2005	Petrolina/PE	Folhas	Red Globe	I	I	5,5 d	4,5 b
UnB 1309	2005	Petrolina/PE	Haste	Festival	VI	I	4,2 e	4,2 b
UnB 1307	2005	Petrolina/PE	Ráquis	Festival	I	I	5,5 d	3,5 c
UnB 1304	2005	Petrolina/PE	Pecíolo	Festival	I	I	4,9 e	4,2 b
UnB 1318	2006	Viveiro Caldas/MG	ND	BRS-Morena	I	I	8,0 b	2,2 d
IBSBF2598	2006	Boa Vista/RR	ND	ND	I	I	3,1 f	4,3 b
Xcv9	2008	Petrolina/PE	ND	Red Globe	I	I	3,5 f	4,5 b
Xcv8	2008	Petrolina/PE	ND	Red Globe	I	VII	3,9 e	4,5 b
Xcv5	2008	Petrolina/PE	Folha	Red Globe	I	VII	4,3 e	4,2 b
IBSBF2647	2008	Ceará	ND	Benitaka	I	I	3,6 f	4,4 b
Xcv90	2009	Juazeiro/BA	Folha	Thompson	I	I	3,5 f	4,9 a
Xcv89	2009	Casa Nova/BA	Folha	Itália Muscat	I	I	2,8 f	4,2 b
Xcv81	2009	Casa Nova/BA	Folha	Thompson	I	I	3,5 f	4,5 b
xcv80	2009	Petrolina/PE	Folha e ramo	Festival	VIII	I	3,6 f	3,7 c
Xcv79	2009	Petrolina/PE	Folha e	Red Globe	I	III	3,8 f	4,1 b

			ramo						
Xcv78	2009	Petrolina/PE	ND	ND	I	I	3,3 f	4,7 a	
Xcv77	2009	Petrolina/PE	Folha e ramo	Festival	I	I	3,9 e	4,8 a	
Xcv76	2009	Petrolina/PE	Folha e ramo	Festival	I	I	2,5 f	5,4 a	
Xcv72	2009	Casa Nova/BA	Folha	Thompson	I	I	3,6 f	4,4 b	
Xcv71	2009	Petrolina/PE	Folha e ramo	Festival	VII	I	3,0 f	3,9 c	
Xcv70	2009	Casa Nova/BA	Folha	Benitaka	I	I	4,8 e	4,7 a	
Xcv68	2009	Casa Nova/BA	Folha	ND	VI	VII	3,0 f	4,1 b	
Xcv65	2009	Casa Nova/BA	Folha e ramo	Itália	I	I	3,1 f	4,7 a	
Xcv56	2009	Casa Nova/BA	ND	Festival	I	I	3,7 f	5,2 a	
Xcv55	2009	Casa Nova/BA	Folha	Festival	I	VI	4,0 e	5,0 a	
Xcv54	2009	Casa Nova/BA	Folha	Festival	IV	I	3,1 f	4,4 b	
Xcv52	2009	Casa Nova/BA	Folha e ramo	Festival	I	II	4,5 e	3,9 c	
Xcv50	2009	Petrolina/PE	Engaço	ND	I	I	4,7 e	4,2 b	
Xcv47	2009	Juazeiro/BA	Folha	Itália	I	I	4,0 e	4,0 b	
Xcv46	2009	Juazeiro/BA	Folha	Festival	I	I	3,4 f	4,3 b	
Xcv45	2009	Juazeiro/BA	Folha	Crimson	I	I	4,5 e	4,9 a	
Xcv44	2009	Juazeiro/BA	Folha	Thompson	III	I	3,5 f	4,5 b	
Xcv42	2009	Juazeiro/BA	Folha e ramo	Crimson	I	I	6,4 c	4,3 b	
Xcv40	2009	Petrolina/PE	Folha	Itália	I	I	5,0 e	3,8 c	
Xcv39	2009	Petrolina/PE	Folha e pecíolo	Festival	III	VII	4,2 e	4,7 a	
Xcv38	2009	Curaçá/BA	Folha	Red Globe	VIII	V	3,5 f	4,8 a	
Xcv34	2009	Petrolina/PE	ND	Thompson	I	I	5,6 d	4,1 b	

Xcv33	2009	Petrolina/PE	ND	Festival	XI	I	4,8 e	4,3 b
Xcv28	2009	Petrolina/PE	ND	Festival	I	I	3,8 f	4,7 a
Xcv26	2009	Petrolina/PE	ND	Thompson	I	I	2,7 f	4,9 a
Xcv24	2009	Curaçá/BA	Folha e ramo	Red Globe	I	I	6,9 c	4,1 b
Xcv21	2009	Petrolina/PE	ND	Thompson	I	I	6,9 c	4,2 b
Xcv19	2009	Petrolina/PE	Folha	ND	I	I	3,1 f	4,7 a
Xcv18	2009	Petrolina/PE	Folha	Festival	I	I	4,5 e	4,9 a
Xcv17	2009	Petrolina/PE	ND	Festival	I	I	3,1 f	4,8 a
Xcv16	2009	Petrolina/PE	ND	Thompson	I	I	4,3 e	4,7 a
Xcv15	2009	Petrolina/PE	Engaço	Festival	I	I	3,5 f	4,5 b
Xcv13	2009	Petrolina/PE	Ramo	Festival	I	II	3,1 f	4,7 a
Xcv124	2009	Petrolina/PE	Folha	Red Globe	I	I	4,1 e	3,5 c
Xcv119	2009	Petrolina/PE	Ramo	Thompson	I	I	2,5 f	5,1 a
Xcv117	2009	Petrolina/PE	Folha	Red Globe	III	VII	4,9 e	5,1 a
Xcv116	2009	Petrolina/PE	Ramo	Thompson	I	III	6,6 c	3,4 c
Xcv114	2009	Petrolina/PE	Ramo	Thompson	I	I	3,9 e	4,4 b
Xcv112	2009	Petrolina/PE	Ramo	Red Globe	I	I	3,3 f	4,3 b
Xcv108	2009	Petrolina/PE	Folha	Itália Melhorada	I	I	3,5 f	4,3 b
Xcv103	2009	Petrolina/PE	Ramo	Festival	I	I	4,1 e	4,5 b
UnB4779-B	2009	Cianorte, PR	ND	Red Globe	I	I	3,8 f	4,7 a
IBSBF2739	2009	Tupi Paulista/SP	Ramo	Red Globe	IX	I	3,3 f	4,7 a
IBSBF2738	2009	Tupi Paulista/SP	Folha	Red Globe	IX	I	3,3 f	4,8 a
Xcv91	2010	Juazeiro/BA	Folha	Thompson	I	I	4,4 e	4,8 a
Xcv158	2010	Petrolina/PE	Folha	Festival	I	I	2,8 f	4,8 a
Xcv156	2010	Petrolina/PE	Folha	Thompson	I	III	3,5 f	4,5 b
Xcv154	2010	Casa Nova/BA	Folha	Red Globe	I	I	3,5 f	5,0 a

Xcv153	2010	Casa Nova/BA	Folha	Red Globe	I	I	3,1 f	5,0 a
Xcv143	2010	Petrolina/PE	Pecíolo	Red Globe	I	I	5,6 d	4,7 a
Xcv142	2010	Juazeiro/BA	Folha	Festival	I	V	3,2 f	4,7 a
Xcv137	2010	Casa Nova/BA	Folha	Thompson	I	I	4,6 e	4,6 b
Xcv133	2010	Petrolina/PE	Ramo	Festival	I	I	4,3 e	4,5 b
Xcv132	2010	Casa Nova/BA	Folha	Thompson	I	I	4,0 e	4,1 b
Xcv129	2010	Juazeiro/BA	Folha	Festival	I	I	3,0 f	5,3 a
Xcv105	2010	Petrolina/PE	ND	ND	I	I	3,4 f	4,5 b
Xcv104	2010	Juazeiro/BA	Folha	Red Globe	I	I	2,6 f	4,6 b
ENA4600	2010	Petrolina/PE	ND	ND	V	I	4,7 e	4,4 b
ENA4598	2010	Petrolina/PE	ND	ND	I	I	3,2 f	4,2 b
Xcv216	2011	Casa Nova/BA	ND	ND	I	I	3,3 f	4,9 a
Xcv214	2011	Casa Nova/BA	Nervura	Thompson	III	I	3,8 f	4,5 b
Xcv210	2011	Petrolina/PE	ND	ND	I	II	4,0 e	4,7 a
Xcv208	2011	Petrolina/PE	Pecíolo	Festival	I	I	3,0 f	4,7 a
Xcv207	2011	Petrolina/PE	Pecíolo	Thompson	III	III	3,7 f	4,9 a
Xcv206	2011	Petrolina/PE	Pecíolo	Festival	I	IV	3,1 f	4,7 a
Xcv204	2011	Petrolina/PE	Nervura	Sugraone	I	I	3,0 f	5,1 a
Xcv203	2011	Petrolina/PE	Nervura	Thompson	II	I	4,0 e	4,4 b
Xcv202	2011	Petrolina/PE	Nervura	Festival	I	I	3,1 f	5,1 a
Xcv201	2011	Petrolina/PE	Nervura	Thompson	I	I	3,5 f	4,5 b
Xcv200	2011	Juazeiro/BA	Nervura	Red Globe	I	I	3,3 f	4,3 b
Xcv198	2011	Petrolina/PE	Nervura	Red Globe	I	I	3,0 f	4,8 a
Xcv197	2011	Petrolina/PE	Ramo	Red Globe	I	I	3,0 f	4,8 a
Xcv192	2011	Juazeiro/BA	Pecíolo	Thompson	VI	I	3,2 f	4,5 b
Xcv191	2011	Juazeiro/BA	Nervura	Thompson	V	I	4,0 e	4,5 b
Xcv181	2011	Juazeiro/BA	Nervura	Red Globe	I	I	3,5 f	4,7 a
Xcv179	2011	Casa Nova/BA	Folha	Benitaka	I	I	3,5 f	4,5 b
Xcv178	2011	Casa Nova/BA	Ramo	Festival	X	II	4,7 e	4,2 b
Xcv176	2011	Juazeiro/BA	Folha	Red Globe	I	I	4,0 e	5,4 a

Xcv171	2011	Petrolina/PE	Nervura	Sugra 18	I	VII	3,3 f	4,7 a
Xcv235	2012	Casa Nova/BA	ND	ND	VI	I	3,9 e	4,4 b
Xcv234	2012	Casa Nova/BA	ND	ND	I	I	4,5 e	4,3 b
Xcv233	2012	Casa Nova/BA	Folha	Red Globe	I	I	4,3 e	5,0 a
Xcv232	2012	Casa Nova/BA	Ramo	Red Globe	I	IV	3,0 f	4,0 b
Xcv231	2012	Casa Nova/BA	Baga	Red Globe	I	I	3,3 f	4,5 b
Xcv230	2012	Casa Nova/BA	Ramo	Red Globe	I	I	4,6 e	5,0 a
Xcv229	2012	Casa Nova/BA	Folha	Red Globe	I	IV	2,9 f	4,7 a
Xcv228	2012	Casa Nova/BA	Folha	Red Globe	I	IV	3,7 f	5,0 a
Xcv227	2012	Casa Nova/BA	Folha	Red Globe	I	I	2,9 f	4,4 b
Xcv226	2012	Casa Nova/BA	Folha	Red Globe	I	I	3,5 f	4,8 a
Xcv225	2012	Petrolina/PE	Folha	Red Globe	I	III	4,1 e	4,4 b
Xcv224	2012	Petrolina/PE	Folha	Red Globe	I	I	3,6 f	4,8 a
Xcv223	2012	Petrolina/PE	Folha	Red Globe	I	I	3,5 f	4,6 b
Xcv222	2012	Petrolina/PE	Folha	Red Globe	I	I	3,5 f	4,1 b
Xcv221	2012	Casa Nova/BA	ND	ND	I	I	3,3 f	4,4 b
CV (%) ^z	-	-	-	-	-	-	31,6	14,8

^s IBSBF1967 (isolado patótipo) = ICMP3867, LMG965 e NCPPB2475. IBSBF: Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (São Paulo, Brasil); ICMP: International Collection of Microorganisms from Plants, (Auckland, New Zealand); LMG: Belgian Coordinated Collections of Micro-organisms (Ghent, Belgium); NCPPB: National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (York, United Kingdom); UnB: Coleção de Bactérias Fitopatogênicas do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília (Distrito Federal, Brasil); ENA: Coleção de Bactérias do Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brasil). Xcv = isolados de *X. campestris* pv. *viticola* da Coleção de Culturas do Laboratório de Fitobacteriologia (LAFIBAC) (Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Pernambuco, Brasil

^t Grupos metabólicos definidos com base em 127 características fenotípicas.

^u Grupos genômicos definidos com base em rep-PCR.

^v Período de incubação: número de dias a partir da inoculação até o surgimento do primeiro sintoma.

^w Severidade: avaliada pela medição da extensão das lesões aos 23 dias após as inoculações.

^x ND: Não Determinado.

^y Média de oito repetições. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não apresentaram diferenças significativas pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

^z CV: coeficiente de variação.

Tabela 2. Características fisiológicas e bioquímicas de 116 isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*

Características ^v	% de reações positivas	<i>h</i>
Reação de Gram ^w	100 (Gram -)	1,00 ^x
Relação com O ₂	100 (Aeróbica)	1,00
Colônias amarelas em YDC	0 (Branca)	1,00
Crescimento em YDC a 33°C	100,0	1,00
Catalase	100,0	1,00
Oxidase	0,0	1,00
Hidrólise do amido	100,0	1,00
Hidrólise de Tween 80	100,0	1,00
Produção de proteases	78,5	0,62
Produção de pigmentos fluorescentes	0,0	1,00
Crescimento em meio cloreto de trifetil tetrazólio (1%)	0,0	1,00
Hidrólise da uréia	0,0	1,00
Hipersensibilidade em folhas de fumo	0,0	1,00
Hipersensibilidade em folhas de tomateiro	85,3	0,59
Ácido L-málico ^y	100,0	1,00
Ácido acético	94,0	0,88
Ácido acetoacético	75,0	0,50
Ácido beta-D,L hidroxibutírico	19,8	0,60
Ácido bromosuccínico	93,1	0,86
Ácido cítrico	97,4	0,95
Ácido D-aspártico	3,4	0,93
Ácido D-galacturônico	88,8	0,78
Ácido D-glucurônico	84,5	0,69
Ácido D-lático metil ester	4,3	0,91
Ácido D-málico	3,4	0,93
Ácido D-sacárico	15,5	0,69

Ácido fórmico	3,4	0,93
Ácido fusídico	0,0	1,00
Ácido glucônico	6,0	0,88
Ácido L-aspártico	67,2	0,34
Ácido L-galactônico lactona	0,0	1,00
Ácido L-glutâmico	94,8	0,90
Ácido L-lático	12,9	0,74
Ácido L-piroglutâmico	4,3	0,91
Ácido múxico	12,9	0,74
Ácido N-acetilgalactosamina	3,4	0,93
Ácido N-acetilneuramínico	0,0	1,00
Ácido nalidíxico	15,5	0,69
Ácido p-hidroxifenilacético	4,3	0,91
Ácido propiônico	87,1	0,74
Ácido quínico	5,2	0,90
Ácido α -ceto-glutárico	100,0	1,00
Ácido α -ceto-butírico	78,4	0,57
Ácido α -hidroxibutírico	11,2	0,78
Ácido γ -aminobutírico	0,0	1,00
Aztreonam	56,9	0,14
Azul de tetrazólio	82,8	0,66
beta-metil D-glicosídeo	4,3	0,91
Bromato de sódio	0,0	1,00
Butirato de sódio	2,6	0,95
Cloreto de lítio	0,0	1,00
D-arabitol	2,6	0,95
D-celobiose	100,0	1,00
Dextrina	92,2	0,84
D-frutose-6-fosfato	88,8	0,78
D-frutose	100,0	1,00

D-fucose	12,1	0,76
D-galactose	100,0	1,00
D-glicose-6-fosfato	57,8	0,16
D-lactose	2,6	0,95
D-maltose	73,3	0,47
D-manitol	3,4	0,93
D-manose	100,0	1,00
D-melobiose	84,5	0,69
D-rafinose	21,6	0,57
D-salicina	12,1	0,76
D-serina	0,0	1,00
D-serina	0,0	1,00
D-sorbitol	0,0	1,00
D-trealose	96,6	0,93
D-turanose	8,6	0,83
Estaquiouse	2,6	0,95
Gelatina	89,7	0,79
Gentiobiose	94,0	0,88
Glicerol	73,3	0,47
Glicil-L-prolina	85,3	0,71
Glucuronamida	91,4	0,83
HCl Guanidina	0,0	1,00
Inosina	19,0	0,62
Lactato de sódio 1%	92,2	0,84
L-alanina	62,9	0,26
L-arginina	6,9	0,86
L-fucose	100,0	1,00
L-histidina	16,4	0,67
Lincomicina	87,1	0,74
L-ramnose	6,9	0,86

L-serina	85,3	0,71
Metil piruvato	78,4	0,57
Minociclina	0,0	1,00
mio-isonitol	2,6	0,95
N-acetil-beta-D-manosamina	26,7	0,47
N-acetil-D-glicosamina	100,0	1,00
NaCl 1%	100,0	1,00
NaCl 4%	3,4	0,93
NaCl 8%	0,0	1,00
Niaproof 4	0,0	1,00
Pectina	100,0	1,00
ph 5	62,1	0,24
pH 6	100,0	1,00
Rifamicina SV	81,0	0,62
Sacarose	100,0	1,00
Telurito de potássio	0,0	1,00
Tetrazólio violeta	9,5	0,81
Trimetil glicose	9,5	0,81
Troleandomicina	2,6	0,95
Tween 40	93,1	0,86
Vancomicina	7,8	0,84
α -D-glicose	100,0	1,00
<hr/>		
Ácido pipemídico (20cg) ^z	44,8	0,10
Amoxicilina (30 μ g)	0,0	1,00
Cefaclor (30 μ g)	5,2	0,90
Cefotaxima (30 μ g)	74,1	0,48
Ceftazidima (30 μ g)	80,2	0,60
Ceftriaxona (30 μ g)	87,9	0,76
Ciprofloxacina (5 μ g)	89,7	0,79
Clindamicina (2 μ g)	4,3	0,91

Cloranfenicol (30µg)	100,0	1,00
Eritromicina (15µg)	100,0	1,00
Estreptomicina (10µg)	81,0	0,62
Imipenen (10µg)	100,0	1,00
Norfloxacin (10µg)	84,5	0,69
Optoquina (5µg)	0,0	1,00
Oxacilina (1µg)	0,0	1,00
Sulfazotrin (25µg)	6,9	0,86
Tetraciclina (30µg)	100,0	1,00
Ticarcilina/ácido clavulânico (85µg)	50,0	0,00
Trimetropina (5µg)	0,0	1,00

^v As características separadas por linha dupla foram obtidas por metodologias distintas.

^w Testes fisiológicos e bioquímicos (SCHAAD et al., 2001.)

^x h = Índice de homogeneidade metabólica: variando de 1, quando o grupo é perfeitamente consistente, ou seja, todos os isolados exibem a mesma reação para a característica fenotípica estudada, a 0, quando 50% dos isolados são positivos para cada característica (VAUTERIN et al. 2005).

^y Testes fenotípicos disponíveis em microplacas Biolog GenIII (Biolog, Inc.).

^z Sensibilidade a antibióticos determinada por meio de antibiogramas realizados com discos comerciais.

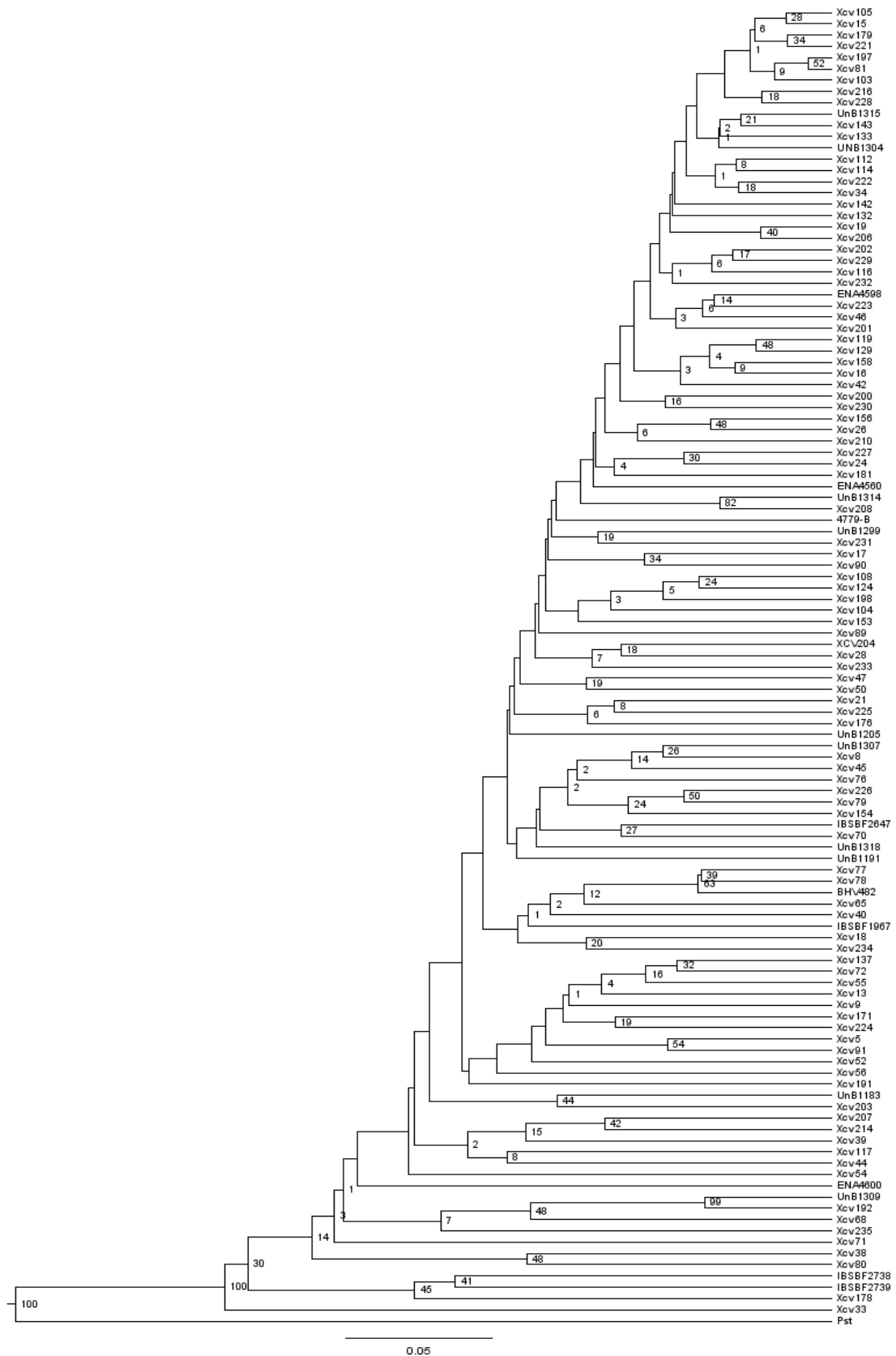


Fig 1. Dendrograma baseado no método UPGMA de acordo com os perfis gerados por meio de 127 características fenotípicas mostrando as relações metabólicas entre isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. A barra indica 5% de diferença nos perfis metabólicos.

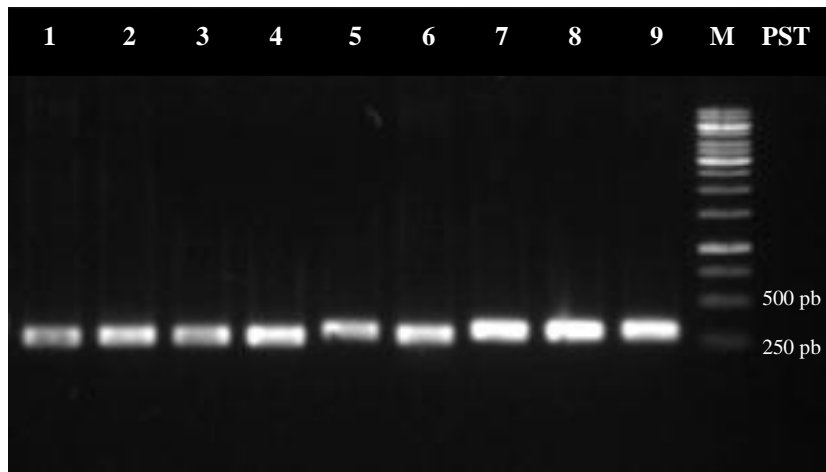


Fig. 2: Análise eletroforética do fragmento de aproximadamente 243 pb gerado com os *primers* Xcv1F/Xcv3R a partir do DNA de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. 1-9 = IBSBF1967, Xcv18, Xcv33, Xcv54, Xcv178, Xcv192, Xcv235, IBSBF2738 e ENA4600, respectivamente; M = Marcador 1 kb DNA Ladder; PST = DNA de *P. syringae* pv. *tomato* como controle positivo.

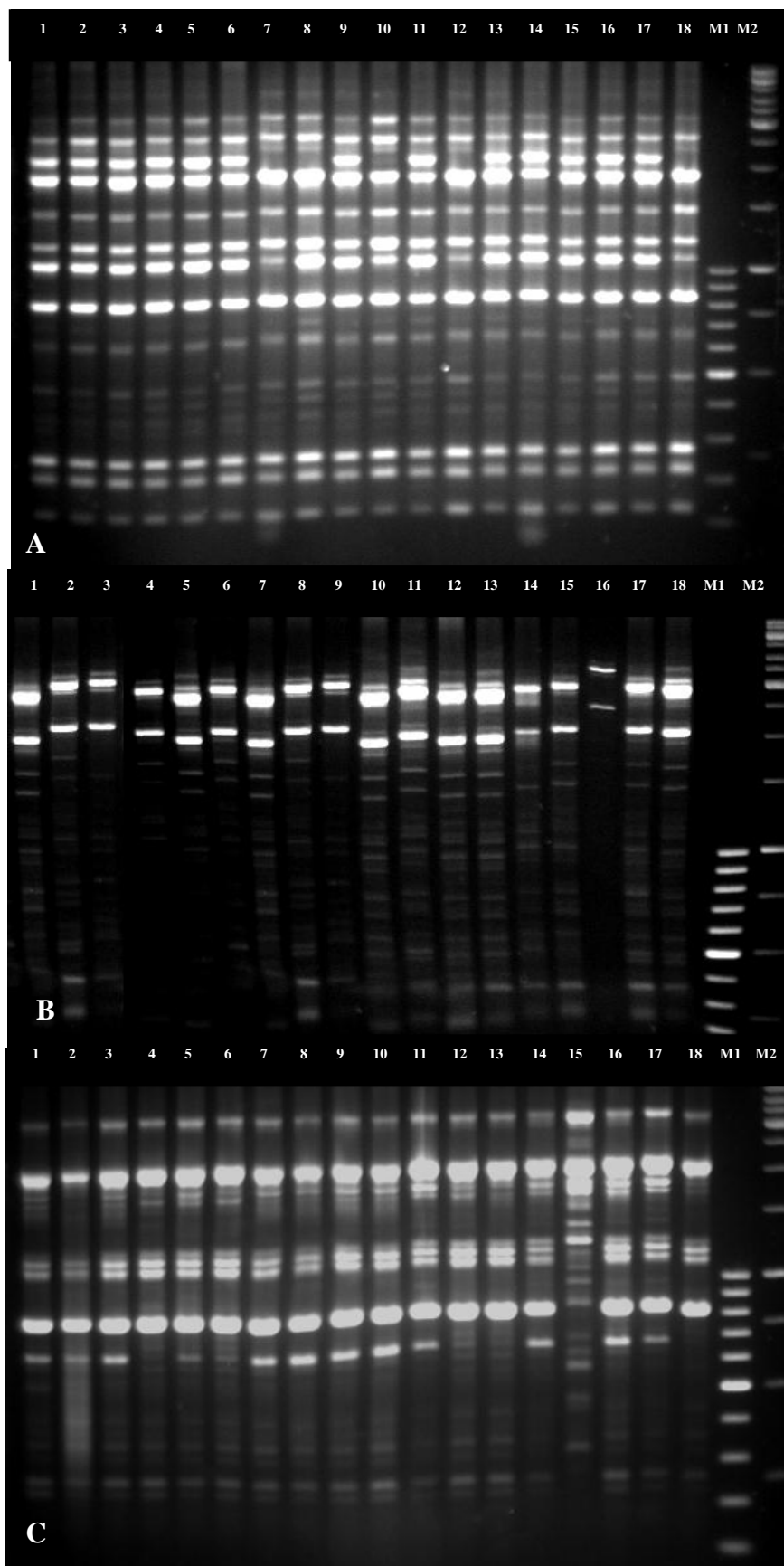


Fig. 3. Análise eletroforética dos fragmentos gerados por meio de REP (A), ERIC (B) e BOX-PCR (C) dos isolados de *X. campestris* pv. *viticola* utilizados neste estudo. 1 – 18 = Isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*; M1 = Marcador 100 pb DNA Ladder; M2 = Marcador 1 kb DNA Ladder.

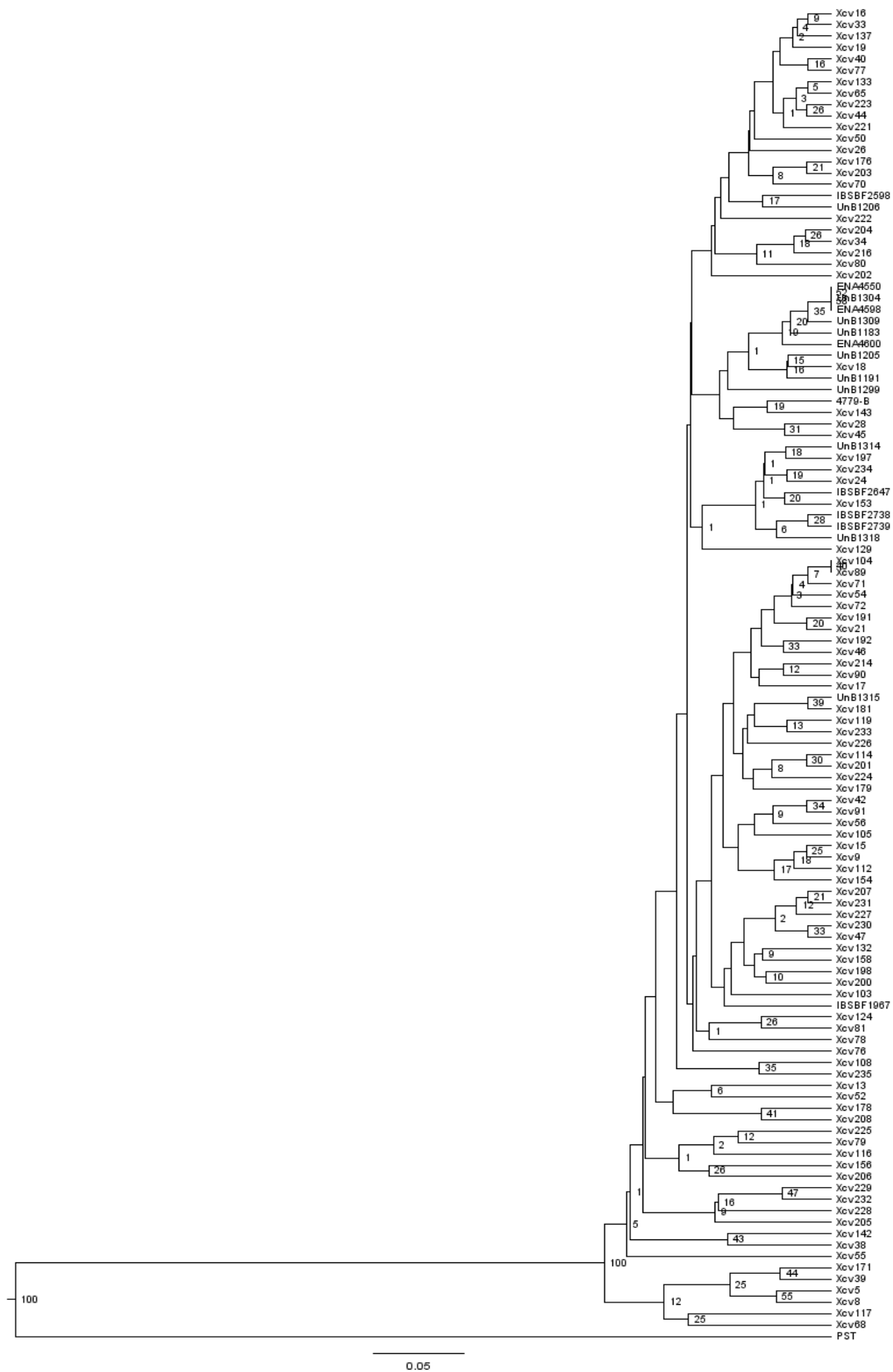


Fig. 4. Dendrograma baseado no método UPGMA de acordo com os perfis gerados por meio de rep-PCR mostrando as relações genômicas entre isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. A barra indica 5% de diferença nos perfis genômicos.

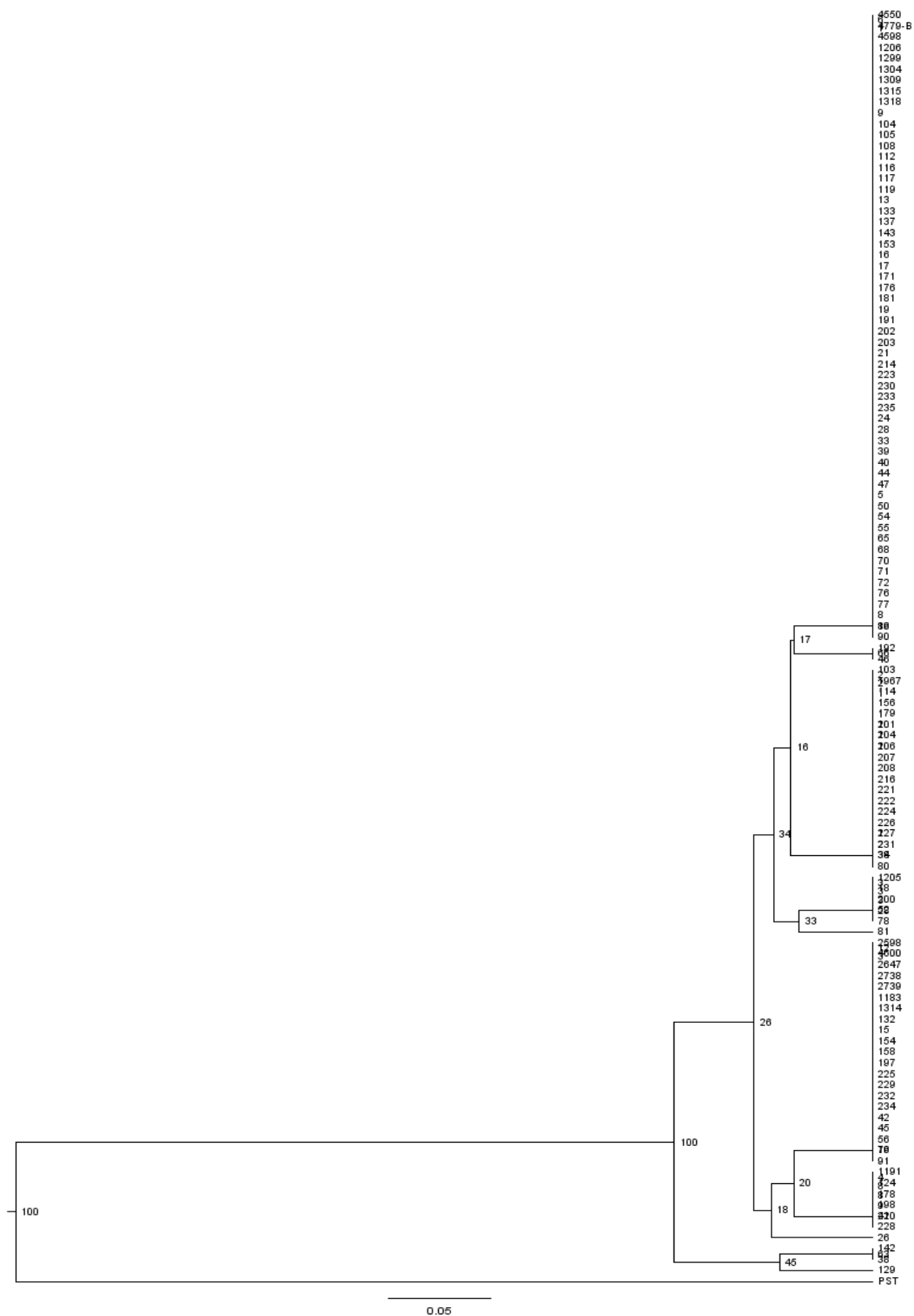


Fig. suplementar 1. Dendrograma baseado no método UPGMA de acordo com os perfis gerados por meio de REP-PCR mostrando as relações genômicas entre isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. A barra indica 5% de diferença nos perfis genômicos.

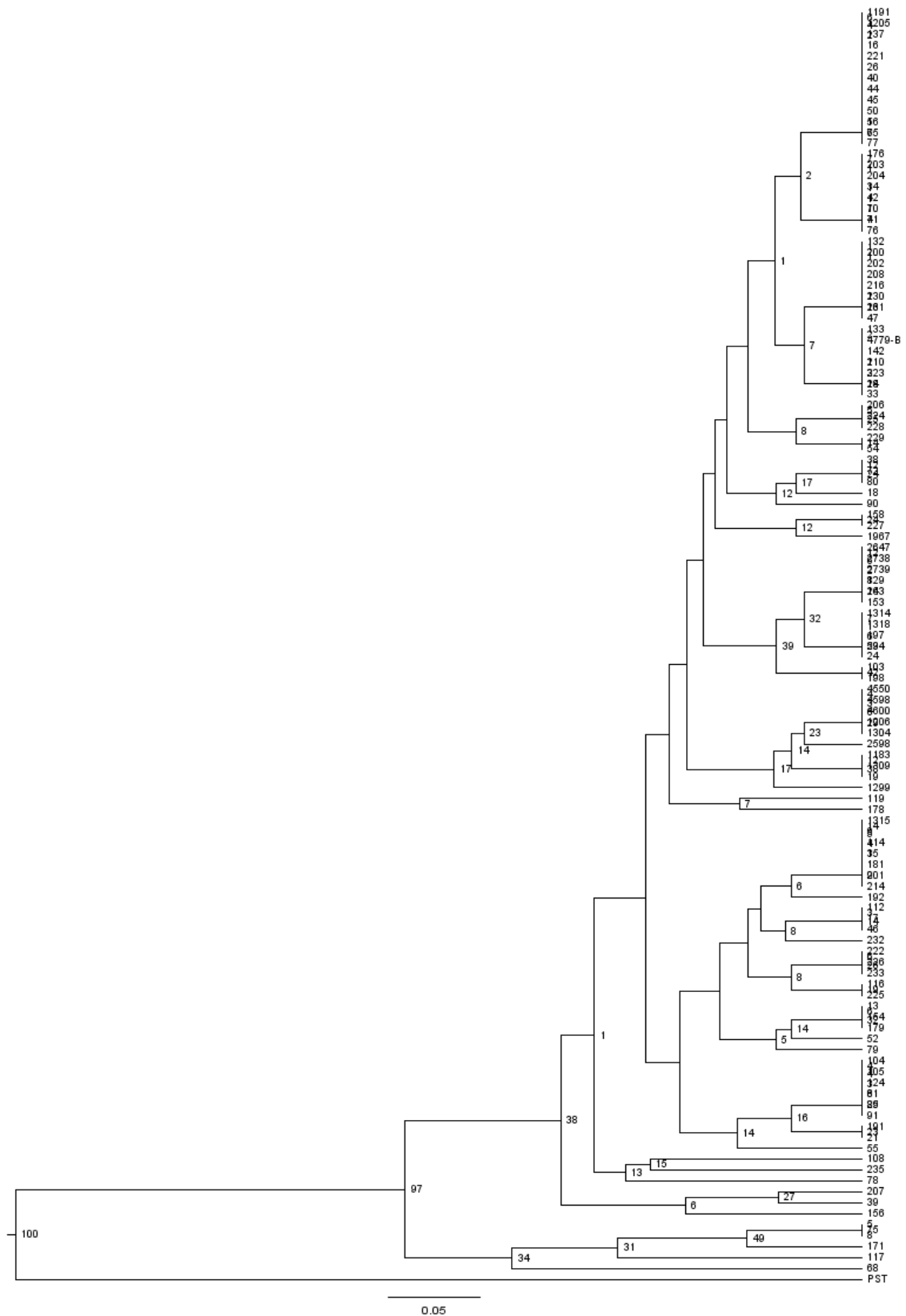


Fig. suplementar 2. Dendrograma baseado no método UPGMA de acordo com os perfis gerados por meio de ERIC-PCR mostrando as relações genômicas entre isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. A barra indica 5% de diferença nos perfis genômicos.

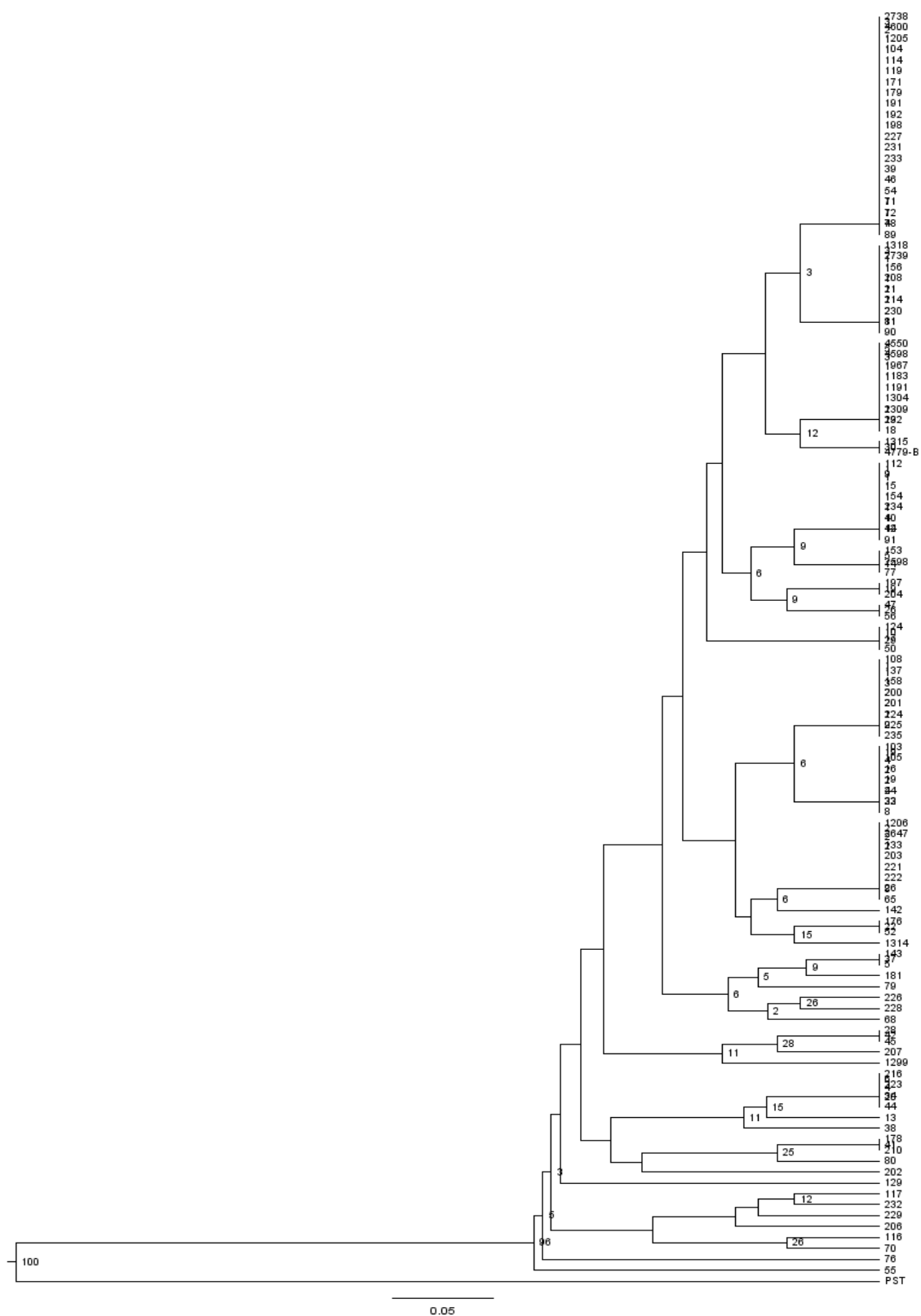


Fig. suplementar 3. Dendrograma baseado no método UPGMA de acordo com os perfis gerados por meio de BOX-PCR mostrando as relações genômicas entre isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. A barra indica 5% de diferença nos perfis genômicos.

CAPÍTULO III

REPOSICIONAMENTO TAXONÔMICO DE ESPÉCIES DE *Xanthomonas*

RELACIONADAS À VIDEIRA E AO CAJUEIRO

32 estreitamente relacionados a *X. axonopodis* pv. *anacardii*, a qual foi abrigada no
33 subgrupo 9.6 de *X. axonopodis*. Os resultados obtidos neste estudo apoiam a proposta
34 para reclassificação de *X. axonopodis* pv. *anacardii* e *X. axonopodis* pv.
35 *mangiferaeindicae* como patovares de *X. citri*. As reclassificações de *X. campestris* pv.
36 *viticola* como *X. citri* pv. *viticola* comb. nov. e dos isolados pigmentados de *X.*
37 *axonopodis* como *X. axonopodis* pv. *anacardii* var. nov. *pigmentatus* são sugeridas.

38

39

40 O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo (FAO, 2014), sendo o
41 Nordeste a principal região produtora e exportadora de frutas tropicais do país (LOPES
42 et al., 2009), respondendo por mais de 99% das exportações nacionais de uva
43 (LAZZAROTTO; FIORAVANÇO, 2013) e por mais de 98% da produção de castanha
44 de caju (IBGE, 2014). Nesta região, o cancro bacteriano causado por *Xanthomonas*
45 *campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, é uma das mais importantes doenças da videira,
46 sendo responsável por danos severos e representando sério potencial de risco ao
47 desenvolvimento da viticultura nacional (ARAUJO et al., 2005). Por sua vez, isolados
48 pigmentados de *X. axonopodis* Starr e Garces relacionados às anacardiáceas, os quais
49 aparentemente são variantes de *X. axonopodis* pv. *anacardii* (Starr e Garces) Ah-You et
50 al., foram recentemente detectados no Nordeste causando lesões em frutos de cajueiros
51 (GAMA et al., 2011). Visto que frutos jovens infectados resultam em castanhas
52 impróprias para a comercialização (VIANA et al., 2006b), esses isolados representam
53 uma séria ameaça para esta cultura na região.

54 Em estudos anteriores, *X. campestris* pv. *viticola* e patovares de *X. axonopodis*
55 relacionados a família anacardiácea apresentaram semelhanças tais como: origem
56 indiana, ausência de xantomonadina (embora isolados variantes pigmentados de *X.*

57 *axonopodis* tenham sido observados na África do Sul, Brasil, Flórida e Ilhas Reunião),
58 características epidemiológicas (ARAUJO, 2001; TRINDADE et al., 2007) e
59 sintomatológicas. Essas fitobactérias também apresentaram reações cruzadas em testes
60 sorológicos (ARAUJO et al., 2005) e elevada similaridade genética revelada por meio
61 de rep-PCR (TRINDADE et al., 2005), indicando que existe um estreito relacionamento
62 entre elas.

63 O agente causal do cancro bacteriano da videira foi denominado inicialmente
64 *Pseudomonas viticola* Nayudu (NAYUDU, 1972), sendo posteriormente reclassificado
65 como *X. campestris* pv. *viticola* (YOUNG et al., 1978), cujo epíteto permanece
66 atualmente válido (BULL et al., 2010). No entanto, desde 1995 a espécie *X. campestris*
67 passou a ser designada para abrigar apenas isolados patogênicos a brassicáceas
68 (VAUTERIN et al., 1995). A partir de então, estudos realizados com base na região *rpf*
69 (TAKITA et al., 2004), no gene *copA* (MARQUES, 2007) e em análises de
70 comparações de sequências genômicas (TAKITA et al., 2006) demonstraram um
71 estreito relacionamento entre *X. campestris* pv. *viticola* e *X. citri* subsp. *citri* (ex Hasse
72 1915) Gabriel et al. (sinonímia *X. axonopodis* pv. *citri*). Contrariando estes resultados,
73 análises de sequências multilocus (*rpoA*, *rpoB* e região espaçadora 16S-23S DNAr)
74 (multilocus sequence analysis - MLSA) e hibridização DNA-DNA demonstraram que
75 *X. campestris* pv. *viticola* está mais relacionada à espécie *X. axonopodis* (FERREIRA-
76 TONIN, 2012; FERREIRA-TONIN et al., 2011).

77 Ao longo dos anos, o posicionamento taxonômico dos patovares de *X.*
78 *axonopodis* relacionados às anacardiáceas foi modificado inúmeras vezes.
79 Originalmente esses patovares foram denominados *Bacillus mangiferae* (DOIDGE,
80 1915), sendo reclassificados como *Pseudomonas mangiferae-indicae* (PATEL et
81 al., 1948a, b) e *Erwinia mangiferae* (BREED et al., 1957) até serem corretamente

82 posicionados no gênero *Xanthomonas*, inicialmente como *X. campestris* pv.
83 *mangiferaeindicae* (ROBBS et al., 1974). Posteriormente, uma nova reclassificação foi
84 realizada com base em variações patológicas e na divergência evolucionária dos
85 genomas observada por polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado
86 (amplified fragment length polymorphisms – AFLP), sendo proposto que *X. campestris*
87 pv. *mangiferaeindicae* fosse separada em três patovares, o que resultou no atual
88 posicionamento taxonômico: *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* (Starr e Garces) Ah-
89 You et al. (mancha angular da mangueira), *X. axonopodis* pv. *anacardii* (mancha
90 angular do cajueiro) e *X. axonopodis* pv. *spondiae* (Starr e Garces) Ah-You et al.
91 (mancha angular do cajá-manga) (AH-YOU et al., 2007).

92 Com base em dados de AFLP, hibridização DNA-DNA e MLSA, foi proposta
93 uma nova reclassificação para os pvs. *mangiferaeindicae* e *anacardii*: *X. citri* pv.
94 *anacardii* e *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* (AH-YOU et al., 2009). No entanto, esses
95 epítetos não foram devidamente validados pelo fato de não estarem de acordo com as
96 normas 17 e 21 do padrão internacional para classificação de patovares de fitobactérias
97 (International Standards for Naming Pathovars of Plant Pathogenic Bacteria), as quais
98 determinam que novas combinações sejam acompanhadas por descrições formais e
99 designadas como pv. nov. ou comb. nov., respectivamente (BULL et al., 2012).
100 Portanto, é importante ter em mente que a classificação atual dos patovares de *X.*
101 *axonopodis* patogênicos a hospedeiros da família Anacardiaceae não reflete o real
102 posicionamento taxonômico de *X. citri* pv. *anacardii* e *X. citri* pv. *mangiferaeindicae*, o
103 que sugere que *X. campestris* pv. *viticola* pode estar mais próxima à *X. citri*, conforme
104 alguns estudos demonstraram (MARQUES, 2007; TAKITA et al., 2004; TAKITA et
105 al., 2006).

106 Visto que *X. campestris* pv. *viticola* é considerada uma praga quarentenária
107 presente (A2) (restrita aos estados da Bahia, Ceará e Pernambuco) no território
108 brasileiro (Instrução Normativa Nº 59/2007) (BRASIL, MINISTÉRIO DA
109 AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2008) e os patovares de *X.*
110 *axonopodis* pv. *anacardii* representam um elevado risco ao cultivo de plantas da família
111 Anacardiaceae no Nordeste brasileiro (GAMA et al., 2011), o estudo do relacionamento
112 entre essas fitobactérias pode contribuir para o esclarecimento das reações cruzadas
113 observadas em testes diagnósticos, aperfeiçoamento de técnicas de detecção e melhor
114 esclarecimento da biologia e posicionamento taxonômico desses fitopatógenos
115 (TRINDADE, et al., 2005). Portanto, o presente estudo foi realizado para analisar
116 detalhadamente o relacionamento entre *X. campestris* pv. *viticola* e patovares de *X.*
117 *axonopodis* patogênicos a membros das anacardiáceas por meio de uma abordagem
118 polifásica envolvendo aspectos metabólicos, patogênicos e moleculares. Além disso, a
119 técnica de MLSA foi utilizada para analisar o relacionamento filogenético dessas
120 fitobactérias com outras espécies de *Xanthomonas*.

121

122 **Material e Métodos**

123 **Isolados bacterianos, condições de cultivo e extração de DNA.** Dezesesseis
124 isolados de *X. campestris* pv. *viticola* e 15 isolados de *X. axonopodis* relacionados às
125 Anacardiaceae (10 isolados pigmentados de *X. axonopodis*, 4 isolados de *X. axonopodis*
126 pv. *anacardii* e 1 isolado de *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae*) foram selecionados
127 com base na variabilidade intrapatovar descrita em estudos anteriores (GAMA, 2014;
128 GAMA et al., 2011) (Tabela 1). Quatro isolados de *X. campestris* pv. *passiflorae* e um
129 isolado de *X. campestris* pv. *campestris*, *X. citri* subsp. *malvacearum*, *X. vesicatoria* e

130 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* foram incluídos nas análises metabólica,
131 epidemiológica e molecular para fins comparativos.

132 Para determinar o posicionamento taxonômico de *X. campestris* pv. *viticola* e
133 dos isolados pigmentados de *X. axonopodis*, as sequências dos genes *gyrB* e *rpoD* de 46
134 isolados representando 24 espécies do gênero *Xanthomonas* e os subgrupos 9.2 a 9.6 de
135 *X. axonopodis sensu* Rademaker et al. (2005) foram selecionadas no banco de dados do
136 GenBank (Tabela 1 suplementar) e incluídas nas análises filogenéticas. A nomenclatura
137 recomendada pelo Comitê sobre a Taxonomia de Fitobactérias da Sociedade
138 Internacional de Fitopatologistas (Committee on the Taxonomy of Plant Pathogenic
139 Bacteria - International Society of Plant Pathology) (BULL et al., 2010; BULL et al.,
140 2012) foi utilizada neste estudo.

141 Exceto quando especificado, os isolados foram cultivados em meio NYDA (20 g
142 de ágar, 10 g de dextrose, 5 g de peptona, 5 g de extrato de levedura e 3 g de extrato de
143 carne completando-se o volume com água destilada esterilizada (ADE) até 1000 ml) por
144 36 h a 29°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$).

145 A extração do DNA dos isolados utilizados neste estudo foi realizada utilizando-
146 se o Kit MiniPrep para extração de DNA genômico bacteriano (Axygen Biosciences,
147 EUA) seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação do DNA genômico foi
148 realizada conforme descrito anteriormente (GAMA et al., 2011).

149 **Caracterização metabólica.** A caracterização metabólica foi realizada por meio
150 do sistema Biolog, Inc (Hayward, Estados Unidos) utilizando-se microplacas Biolog
151 GenIII (71 fontes de carbono e 23 substâncias inibitórias) de acordo com as
152 recomendações do fabricante. Os isolados foram cultivados em meio BUG[®] (Biolog
153 Universal Growth) a 29°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) por 36 h e as suspensões foram preparadas no fluido
154 para inoculação IF-A, ajustando-se a transmitância para 95%. Em seguida, 150 μl da

155 suspensão foram adicionados aos poços das microplacas, as quais foram incubadas a
156 33°C por 36 h. As avaliações foram realizadas visualmente observando-se a mudança de
157 coloração dos poços. O experimento foi repetido com 20 isolados selecionados ao acaso
158 para comprovação dos perfis gerados.

159 Os 94 testes fenotípicos realizados foram registrados como positivos (1) ou
160 negativos (0) e os perfis fenotípicos gerados foram analisados pelo programa FreeTree
161 (PAVLICEK et al., 1999). Para determinação dos relacionamentos metabólicos entre os
162 isolados utilizou-se o coeficiente de similaridade de Jaccard, sendo a árvore de distância
163 construída pelo método UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic
164 averages). A confiabilidade dos ramos foi estimada pelo método de *bootstrap* com 1000
165 repetições.

166 O nível médio de homogeneidade interna (h) foi calculado com base nas 94
167 características fenotípicas estudadas para avaliar a consistência dos perfis metabólicos
168 das espécies/patovares estudadas. O valor de h varia de 1, quando o grupo é
169 perfeitamente consistente, ou seja, todos os isolados exibem a mesma reação para cada
170 característica fenotípica estudada, a 0, quando 50% dos isolados são positivos para cada
171 característica (VAUTERIN et al., 1995).

172 **Caracterização epidemiológica.** Em experimentos distintos, cinco isolados de
173 *X. campestris* pv. *viticola* (IBSBF1967, Xcv55, Xcv68, Xcv108 e Xcv178), cinco
174 isolados pigmentados de *X. axonopodis* (Taq3, Taq9, Taq13, XcmF1 e XcmF2), três
175 isolados de *X. axonopodis* pv. *anacardii* (IBSBF657, IBSBF1509 e IBSBF2579) e um
176 isolado de *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* (IBSBF2586) foram inoculados em: I
177 – folhas de mudas de videira (*V. vinifera* cv. Red Globe); e II – folhas de cajueiro (clone
178 CCP76). As inoculações foram realizadas com auxílio de seringa hipodérmica sem
179 agulha em quatro pontos do limbo foliar (AH-YOU et al., 2007; GAMA et al., 2011).

180 Folhas inoculadas apenas com ADE constituíram o controle negativo. O delineamento
181 experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo cada
182 repetição constituída por uma folha com quatro pontos de inoculação por isolado. Após
183 as inoculações, as mudas foram incubadas em casa de vegetação e avaliadas diariamente
184 durante 12 dias para determinação do período de incubação, que é o número de dias
185 desde a inoculação até o aparecimento do primeiro sintoma. A severidade da doença foi
186 avaliada aos 12 dias após a inoculação estimando-se a extensão das lesões em sentidos
187 diametralmente opostos. O experimento foi realizado duas vezes.

188 Visto que não foram observadas diferenças significativas ($P \leq 0,05$) quanto às
189 variâncias das réplicas dos experimentos, os dados foram avaliados como repetições no
190 tempo. Os pressupostos da análise de variância (ANOVA) foram checados pelos Testes
191 de Shapiro-Wilk e Levene com auxílio do programa Statistix 9 (Tallahassee, Flórida,
192 Estados Unidos). As médias foram comparadas pelo Teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$) com
193 auxílio do programa SAEG versão 9.0 (Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa,
194 Minas Gerais, Brasil) e pelo Teste LSD com auxílio do programa Statistix 9.

195 **Caracterização molecular.** As análises de REP, ERIC e BOX-PCR foram
196 realizadas segundo Louws et al. (1994), com algumas modificações: 1X de PCR Master
197 Mix 2X (0,05 U/ μ l de Taq DNA polimerase, tampão de reação, 4 mM de $MgCl_2$, 0,4
198 mM de cada dNTP), 2 μ M de cada *primer* e 200 ng de DNA. As amostras foram
199 amplificadas em termociclador modelo PTC-100 (MJ Research, Waltham, Estados
200 Unidos). Controles negativos (reações livres de DNA) foram incluídos em todos os
201 experimentos para verificar a presença de contaminantes. Doze microlitros de cada
202 reação de amplificação foram misturados a 3 μ l do tampão de carregamento e 2,5 μ l de
203 SYBER[®] Safe, aplicando-se um volume total de 17,5 μ l em cada poço do gel. A
204 visualização dos fragmentos amplificados foi realizada em gel de agarose a 1,5%. A

205 corrida eletroforética foi realizada durante 3 h a 80 V em tampão TBE 0,5 X, utilizando-
206 se o marcadores GenRuler 100 bp DNA Ladder (Burlington, Fermentas Life Sciences,
207 Canadá) e GenRuler 1 kb bp DNA Ladder (Burlington, Fermentas Life Sciences,
208 Canadá). Posteriormente, o gel foi fotodocumentado. As análises foram realizadas duas
209 vezes.

210 As análises dos perfis de amplificação gerados com os *primers* REP, ERIC e
211 BOX-PCR foram realizadas visualmente de acordo com a presença (1) ou ausência de
212 bandas (0) de 100 a 3000 pb, sendo registradas apenas bandas reprodutíveis (presentes
213 nas duas análises). Os dados gerados com cada *primer* foram analisados separadamente
214 e em conjunto pelo programa FreeTree (PAVLICEK et al., 1999). Para determinação
215 dos relacionamentos genéticos entre os isolados foi utilizado o coeficiente de
216 similaridade de Jaccard, sendo a árvore de distância construída pelo método UPGMA.
217 Análises de *bootstrap* com 1000 repetições foram conduzidas para avaliar a consistência
218 interna dos ramos (HAMPL et al., 2001).

219 **Caracterização filogenética.**

220 *Amplificação e sequenciamento.* Foram utilizados *primers* desenvolvidos para
221 amplificar sequências parciais dos genes *housekeeping gyrB* (subunidade beta da DNA
222 girase) e *rpoD* (subunidade sigma da RNA polimerase) (YOUNG et al., 2008) e do gene
223 de patogenicidade e reação de hipersensibilidade *hrpB* (LEITE JR. et al., 1994). As
224 reações foram compostas por: 1X de PCR Master Mix, 0,5 μ M de cada *primer* e 200 ng
225 de DNA. As amostras foram amplificadas em termociclador modelo PTC-100 e
226 submetidas às seguintes condições: *gyrB* e *rpoD* – 94°C por 3 min, seguindo-se 30
227 ciclos de 30 s a 94°C para desnaturação, 30 s a 54°C para anelamento dos *primers* e 1
228 min a 72°C para extensão da nova fita; *hrpB* – 95°C por 3 min, seguindo-se 30 ciclos de
229 30 s a 95°C para desnaturação, 30 s a 52°C para anelamento dos *primers* e 1 min a 72°C

230 para extensão da nova fita. Um ciclo de 10 min a 72°C foi realizado para extensão final
231 das sequências dos três genes. Controles negativos (reações livres de DNA) foram
232 incluídos em todos os experimentos para verificar a presença de contaminantes. A
233 visualização dos fragmentos amplificados foi realizada em gel de agarose a 1% e a
234 corrida eletroforética realizada durante 1,5 h a 80 V em tampão TBE 0,5X, utilizando-se
235 o marcador GenRuler 100 pb DNA Ladder. A purificação dos produtos de PCR foi
236 realizada com auxílio do Kit Clean-up (Axygen Biosciences, Union City, EUA) e o
237 sequenciamento das fitas *foward* e *reverse* para cada marcador foi realizado pela
238 Macrogen[®] (Seul, Coréia do Sul). A análise da qualidade das sequências de
239 nucleotídeos e a montagem dos contigs foram realizadas com auxílio do Staden Package
240 (STADEN et al. 1998).

241 *Análises filogenéticas.* As sequências de nucleotídeos foram alinhadas com
242 auxílio do Muscle (EDGAR et al., 2004) disponível no MEGA v. 5.20 (TAMURA et al.,
243 2011), e manualmente ajustadas para permitir a máxima similaridade das sequências. As
244 extremidades das sequências foram aparadas, resultando em sequências de 797
245 nucleotídeos para *gyrB*, 563 nucleotídeos para *rpoD* e 731 nucleotídeos para *hrpB*.

246 Foram realizadas duas abordagens para MLSA. Na primeira abordagem foram
247 realizadas análises com os isolados de *Xanthomonas* utilizados neste estudo (Tabela 1)
248 em conjunto com 24 espécies de *Xanthomonas* coletadas no GenBank (Tabela 1
249 suplementar) por meio das sequências parciais dos genes *gyrB* e *rpoD* isoladamente e da
250 sequência concatenada. Na segunda abordagem, foram realizadas análises visando um
251 delineamento infrasubespecífico mais preciso a partir das sequências parciais dos genes
252 *gyrB*, *rpoD* e *hrpB* isoladamente e da sequência concatenada. Nesta segunda
253 abordagem, apenas os isolados utilizados neste estudo foram analisados. A
254 incongruência entre as sequências dos genes concatenados nas duas abordagens foi

255 avaliada com auxílio do programa PAUP* v. 4.0b10 (SOWFFORD, 2002) por meio do
256 teste de homogeneidade de partição, realizado com base na análise das diferenças do
257 comprimento das incongruências (ILD) com 100 pseudoreplicações (*bootstrap*). Uma
258 matriz de distância foi construída por meio do modelo Kimura 2 parâmetros, para as
259 duas abordagens descritas acima, com auxílio do programa MEGA v. 5.20.

260 As sequências isoladas e concatenadas foram comparadas utilizando Neighbor-
261 Joining (NJ) e Máxima de Parcimônia com auxílio do programa MEGA v. 5.20. Para as
262 análises de NJ foi utilizado o modelo de Kimura 2 parâmetros. As análises de máxima
263 parcimônia foram realizadas pelo método de buscas heurísticas TBR. Análises de
264 *bootstrap* com 1000 repetições foram realizadas para estimar a confiabilidade dos ramos
265 das árvores geradas pelos três métodos. Análises de Máxima Verossimilhança e
266 Inferência Bayesiana foram realizadas utilizando-se modelos de substituição de
267 nucleotídeos selecionados por meio do critério de informações bayesiano (bayesian
268 information criterion – BIC) com auxílio do JModelTest 2.1.3 (POSADA, 2008). As
269 análises de Máxima Verossimilhança foram realizadas com *bootstrap* de 1000
270 repetições com auxílio do programa PhyML 3.1 (GUINDON; GASCUEL, 2003). As
271 análises de Inferência Bayesiana foram realizadas com auxílio do programa BEAST
272 v.1.8.0 (DRUMMOND et al., 2012), com 100.000.000 (*gyrB* e *rpoD*) e 1.000.000.000
273 (*gyrB*, *rpoD* e *hrpB*) gerações de Monte Carlo Cadeia de Markov, sendo realizadas
274 amostragens a cada 1.000 e 10.000 gerações, iniciando-se o processo a partir de uma
275 árvore aleatória. A convergência dos parâmetros foi conferida com auxílio do programa
276 Tracer (RAMBAUT; DRUMMOND, 2007).

277

278

279

280 **Resultados**

281 **Caracterização metabólica.** O relacionamento entre *X. campestris* pv. *viticola* e
282 os patovares de *X. axonopodis* relacionados às anacardiáceas é representado pelo
283 percentual de isolados com reações positivas ou negativas para cada um dos 94 testes
284 bioquímicos (Tabela 2). O nível médio de homogeneidade interna (*h*) foi de 0,82, 0,84,
285 0,81 e 0,86 para os grupos de isolados de *X. campestris* pv. *viticola*, *X. axonopodis* pv.
286 *passiflorae*, isolados pigmentados de *X. axonopodis* e *X. axonopodis* pv. *anacardii*,
287 respectivamente, indicando baixa heterogeneidade metabólica dentro de cada grupo
288 (Tabela 2). O valor de *h* para o grupo formado por todos esses isolados foi de 0,78,
289 indicando baixa variabilidade metabólica entre os isolados. A análise de agrupamento
290 realizada com base nas 94 características fenotípicas reuniu todos os isolados de
291 *Xanthomonas* em um único grupo com valores acima de 71% de similaridade e valores
292 de 100% de *bootstrap* (Fig. 1).

293 **Caracterização epidemiológica.** Todos os isolados foram capazes de causar
294 lesões em folhas de cajueiro (Fig. 2A). A análise de agrupamento realizada com os
295 dados epidemiológicos permitiu a identificação de dois grupos (A e B) com base no
296 período de incubação: grupo A, composto por dois isolados de *X. campestris* pv.
297 *viticola* e um isolado de *X. axonopodis* pv. *anacardii* e período de incubação 4,0 a 4,3
298 dias e; grupo B, composto pelos demais isolados e período de incubação de 2,5 a 3,5
299 dias (Tabela 3). Foram identificados seis grupos (A-F) com base nos dados da
300 severidade: grupo A, composto por dois isolados pigmentados de *X. axonopodis* e
301 severidade de 6,9 a 7,4 mm; grupo B, composto por um isolado pigmentado de *X.*
302 *axonopodis* e severidade de 5.8 mm; grupo C, composto por um isolado de *X.*
303 *axonopodis* pv. *anacardii* e severidade de 5.2 mm; grupo D, composto por um isolado
304 pigmentado de *X. axonopodis* e severidade de 4.9 mm; grupo E, composto por quatro

305 isolados de *X. campestris* pv. *viticola*, três isolados de *X. axonopodis* pv. *anacardii* e o
306 isolado de *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* e severidade de 3,5 a 4,3 mm e; grupo
307 F, formado pelo isolado patótipo de *X. campestris* pv. *viticola* (IBSBF1967) e
308 severidade de 1.5mm.

309 Apenas isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* foram capazes de
310 causar lesões foliares em videira (Fig. 2B). No entanto, não foram observadas
311 diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os isolados para as variáveis analisadas (dados
312 não apresentados).

313 **Caracterização molecular.** A amplificação do DNA genômico das
314 espécies/patovares de *Xanthomonas* por meio da técnica de rep-PCR gerou um total de
315 95 bandas reprodutíveis variando de 100 a 3000 pb, sendo observadas 32, 27 e 36
316 bandas com os *primers* REP, ERIC e BOX, respectivamente (Fig. 3). As análises de
317 agrupamento realizadas com base nos dados de REP, ERIC e BOX isoladamente (dados
318 não apresentados) corroborou com a análise dos dados combinados linearmente (Fig. 4),
319 permitindo a formação de um único grupo abrigando todos os isolados de *Xanthomonas*
320 e a diferenciação de *P. syringae* pv. *tomato* ao nível de 58% de similaridade e valores de
321 100% de *bootstrap* (Fig. 4). Foi observada a formação de seis grupos ao nível de 64%
322 de similaridade: grupo I, composto por isolados de *X. axonopodis* pv.
323 *mangiferaeindicae*, *X. campestris* pv. *viticola* e *X. citri* subsp. *malvacearum*; grupo II,
324 composto por isolados pigmentados de *X. axonopodis* e *X. axonopodis* pv. *anacardii*;
325 grupo III, composto por *X. vesicatoria*, grupo IV, composto pelo isolado de *X.*
326 *axonopodis* pv. *passiflorae*; grupo V, composto por *X. campestris* pv. *campestris* e;
327 grupo VI, composto por *P. syringae* pv. *tomato*. Adicionalmente, os grupos I, II e III
328 encontrados neste estudo corresponderam respectivamente, aos grupos 9.5, 9.6 e 9.2 de
329 *X. axonopodis* (RADEMAKER et al., 2005).

330 Foi observada a formação de duas linhas evolucionárias para os isolados de *X.*
331 *campestris* pv. *viticola*, com 100% de *bootstrap* (GAMA, 2014) (Fig. 4). Os isolados
332 pigmentados de *X. axonopodis* e os isolados de *X. axonopodis* pv. *anacardii*
333 apresentaram-se estreitamente relacionados, sendo abrigados em um único grupo com
334 mais de 70% de similaridade. No entanto, foi observada a formação de três linhas
335 evolucionárias. Uma linha evolucionária foi formada por um isolado de *X. axonopodis*
336 pv. *anacardii* (IBSBF2579) e a segunda linha foi formada pelos demais isolados, os
337 quais se dividiram em outras duas linhas evolucionárias, uma contendo três isolados
338 pigmentados de *X. axonopodis* (CCP76, PC2 e CAST2) e a outra contendo os demais
339 isolados pigmentados de *X. axonopodis* e *X. axonopodis* pv. *anacardii*. As três linhas
340 evolucionárias foram apoiadas por valores superiores a 90% de *bootstrap*. Similarmente
341 aos isolados de *X. campestris* pv. *viticola*, os isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*
342 foram divididos em duas linhas evolucionárias com valor de 100% de *bootstrap*. Uma
343 linha foi formada por um isolado apigmentado (IBSBF960), enquanto a outra linha foi
344 formada por três isolados, sendo um apigmentado (IBSBF1007) e dois pigmentados
345 (IBSBF1343 e Xap1163).

346 **Caracterização filogenética.** Na primeira abordagem realizada com os isolados
347 de *Xanthomonas* utilizados neste estudo (Tabela 1) em conjunto com 24 espécies de
348 *Xanthomonas* coletadas no GenBank (Tabela 1 suplementar), as árvores filogenéticas
349 construídas com base nas sequências parciais dos genes *gyrB* e *rpoD* analisados
350 isoladamente apresentaram estruturas semelhantes pelos métodos de Neighbor-Joining,
351 Máxima de Parcimônia, Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana. A análise de
352 ILD demonstrou que as sequências dos genes *gyrB* e *rpoD* foram altamente congruentes
353 com a sequência concatenada ($P = 0,01$). As árvores filogenéticas, geradas com a
354 sequência concatenada (1360 nucleotídeos) pelos quatro métodos citados também

355 apresentaram estruturas semelhantes. A árvore filogenética obtida por meio de
356 Inferência Bayesiana com o modelo geral de tempo-reverso (general time reversible –
357 GTR), com variação gamma (G) e proporções de sítios invariáveis (I), proporcionou
358 uma reprodução fiel do atual posicionamento taxonômico das espécies e patovares de
359 *Xanthomonas* (Fig. 5) Dois grupos foram formados com ramos bem apoiados
360 (probabilidade posterior acima de 99%): grupo I, formado por *X. albilineans*, *X.*
361 *hyacinthi*, *X. theicola*, *X. translucens* e *X. sacchari*; e grupo II, formado por *X.*
362 *arboricola*, *X. axonopodis*, *X. bromi*, *X. campestris*, *X. cassavae*, *X. citri*, *X. codiae*, *X.*
363 *cucurbitae*, *X. cynarae*, *X. fragariae*, *X. gardneri*, *X. hortorum*, *X. melonis*, *X. oryzae*, *X.*
364 *perforans*, *X. pisi*, *X. populi*, *X. vasicola* e *X. vesicatoria*. Adicionalmente, os subgrupos
365 9.2, 9.3, 9.4, 9.5 e 9.6 de *X. axonopodis sensu* Rademaker et al. (2005) foram
366 satisfatoriamente reproduzidos.

367 Os isolados de *X. campestris* pv. *viticola*, isolados pigmentados de *X.*
368 *axonopodis* relacionados às anacardiáceas e os isolados de *X. axonopodis* pv.
369 *passiflorae* foram reunidos nos grupos 9.5, 9.6, e 9.4 de *X. axonopodis sensu*
370 Rademaker et al. (2005), respectivamente. Além disso, os grupos 9.5 e 9.6
371 apresentaram-se estreitamente relacionados, conforme demonstrado pela elevada
372 probabilidade posterior apoiando esse ramo (100%). A matriz de distância calculada
373 com base no modelo Kimura 2 parâmetros permitiu a avaliação das relações entre os
374 isolados. As distâncias internas nos subgrupos 9.5 e 9.6 foram sempre menores do que
375 0,007 substituições de nucleotídeos por sítio. Entre esses dois grupos, as substituições
376 de nucleotídeos por sítio variaram entre 0,016 e 0,017.

377 Na segunda abordagem realizada apenas com os isolados de *Xanthomonas*
378 utilizados neste estudo (Tabela 1), as árvores filogenéticas construídas com base nas
379 sequências parciais dos genes *gyrB*, *rpoD* e *hrpB* analisadas isoladamente apresentaram

380 estruturas semelhantes pelos métodos de Neighbor-Joining, Máxima de Parcimônia,
381 Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana. Além disso, independentemente do
382 método selecionado, a análise individual dos três genes reproduziram satisfatoriamente
383 os subgrupos 9.2, 9.4, 9.5 e 9.6 de *X. axonopodis*, embora apenas o gene *hrpB* tenha
384 sido capaz de delinear relacionamentos infrasubespecíficos.

385 A análise de ILD demonstrou que as sequências dos genes *gyrB*, *rpoD* e *hrpB*
386 (2091 nucleotídeos) foram altamente incongruentes com a sequência concatenada ($P=$
387 $0,35$). A árvore filogenética gerada com a sequência parcial do gene *hrpB* por meio de
388 Inferência Bayesiana com o modelo GTR e proporções de sítios invariáveis (I),
389 posicionou os isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* no subgrupo 9.5 e os
390 isolados pigmentados de *X. axonopodis* relacionados as anacardiáceas nos subgrupos
391 9.6 (Fig. 6). No entanto, no subgrupo 9.5, todos os isolados de *X. campestris* pv. *viticola*
392 foram agrupados separadamente dos isolados de *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae*
393 (IBSBF 2586) e *X. citri* subsp. *malvacearum* (IBSBF1733) com valores acima de 99%
394 de probabilidade posterior. Semelhantemente, no subgrupo 9.6, todos os isolados
395 pigmentados de *X. axonopodis* foram agrupados separadamente dos isolados de *X.*
396 *axonopodis* pv. *anacardii* com valores acima de 99% de probabilidade posterior,
397 indicando alta confiabilidade do ramo. Com base na matriz de distância calculada por
398 meio do modelo Kimura 2 parâmetros, todos os isolados pigmentados de *X. axonopodis*
399 apresentaram distâncias menores do que 0,001 substituições de nucleotídeos por sítio
400 entre si, enquanto distâncias de 0,003 a 0,004 substituições de nucleotídeos por sítio
401 foram observadas entre esses isolados e *X. axonopodis* pv. *anacardii*.

402

403

404

405 **Discussão**

406 O relacionamento entre isolados de *X. campestris* pv. *viticola* e patovares de *X.*
407 *axonopodis* patogênicos a membros das anacardiáceas foi analisado por meio do estudo
408 detalhado dos perfis metabólico, epidemiológico e molecular. A técnica de MLSA foi
409 utilizada para reposicionar isolados de *X. campestris* pv. *viticola* e isolados pigmentados
410 de *X. axonopodis* relacionados ao cajueiro dentro dos subgrupos de *X. axonopodis*
411 definidos com base em rep-PCR *sensu* Rademaker et al.(2005).

412 A análise de agrupamento realizada com base nos perfis metabólicos revelou
413 elevada similaridade entre os isolados de *Xanthomonas* analisados neste estudo (Fig. 1),
414 não sendo possível diferenciá-los satisfatoriamente por meio desta técnica. No passado,
415 a classificação de fitobactérias era realizada com base em testes metabólicos *in vitro* e
416 na gama de hospedeiros, o que levou à classificação de mais de 100 fitobactérias como
417 patovares de *X. campestris* (YOUNG et al., 1978). Além de *X. campestris* pv. *viticola*,
418 cuja classificação permanece desatualizada, neste grupo estavam abrigados isolados de
419 *X. axonopodis* relacionados às anacardiáceas, *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, *X. citri*
420 subsp. *malvacearum* e *X. vesicatoria*, os quais eram diferenciados apenas pela gama de
421 hospedeiros, o que justifica a elevada similaridade metabólica observada entre esses
422 isolados.

423 Apesar da elevada similaridade metabólica observada entre os isolados de
424 *Xanthomonas*, alguns testes apresentaram elevado poder discriminatório e, portanto, a
425 sua combinação pode ser útil para auxiliar a diferenciação das espécies/patovares
426 analisadas neste estudo. Por exemplo, todos os isolados pigmentados de *X. axonopodis* e
427 o isolado de *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* apresentaram reação positiva e todos
428 os isolados de *X. axonopodis* pv. *anacardii* apresentaram reações negativas para a
429 utilização do ácido L-aspartico como fonte de carbono. Já os isolados pigmentados de

430 *X. axonopodis* e *X. axonopodis* pv. *anacardii* apresentaram reação negativa e *X.*
431 *axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* apresentou reação positiva para utilização do ácido
432 γ -aminobutírico como fonte de carbono.

433 Tanto os isolados de *X. campestris* pv. *viticola* quanto os isolados de *X.*
434 *axonopodis* relacionados às anacardiáceas selecionados para o estudo dos perfis
435 epidemiológicos foram patogênicos ao cajueiro clone CCP76 (Tabela 3). Os cinco
436 grupos (A–E) formados por isolados pigmentados de *X. axonopodis* e *X. axonopodis* pv.
437 *anacardii*, identificados em estudos anteriores com base na severidade de lesões foliares
438 provocadas por meio de inoculações artificiais (GAMA et al., 2011), foram
439 confirmados. Todos os isolados de *X. campestris* pv. *viticola* foram abrigados nos
440 grupos menos agressivos (grupos E e F da severidade), indicando baixa agressividade
441 desses isolados ao cajueiro. Por sua vez, os isolados pigmentados de *X. axonopodis*
442 apresentaram menores períodos de incubação e maiores valores de severidade,
443 indicando uma maior agressividade desses isolados ao cajueiro, conforme demonstrado
444 anteriormente (GAMA et al., 2011). Por outro lado, apenas isolados de *X. campestris*
445 pv. *viticola* foram capazes de causar lesões em folhas de videira cv. Red Globe, o que se
446 caracteriza como uma importante informação para diferenciação e caracterização desses
447 isolados.

448 A análise de agrupamento realizada com base nos dados de rep-PCR (Fig. 4) foi
449 capaz de reproduzir satisfatoriamente os subgrupos 9.2, 9.5, 9.6 de *X. axonopodis sensu*
450 Rademaker et al., (2005). Os isolados de *X. campestris* pv. *viticola*, *X. axonopodis* pv.
451 *mangiferaeindicae* e *X. citri* subsp. *malvacearum* apresentaram elevada similaridade
452 genética, sendo abrigados em um único grupo ao nível de 64% de similaridade. O
453 subgrupo 9.5 de *X. axonopodis* foi formado originalmente por isolados de *X. citri* subsp.
454 *citri* e *X. citri* subsp. *malvacearum*, dentre outras fitobactérias (RADEMAKER et al.,

455 2005) e, mais recentemente, por *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* (AH-YOU et al.,
456 2007; AH-YOU et al., 2009), indicando um estreito relacionamento de *X. campestris*
457 pv. *viticola* com este subgrupo e, conseqüentemente, com *X. citri*, conforme descrito em
458 outros estudos (MARQUES, 2007; TAKITA et al., 2004; TAKITA et al., 2006).
459 Adicionalmente, foi observada a formação de duas linhas evolucionárias distintas entre
460 os isolados de *X. campestris* pv. *viticola*, demonstrando a existência de variabilidade
461 genética entre os isolados e confirmando os resultados obtidos anteriormente (GAMA,
462 2014).

463 Os isolados pigmentados de *X. axonopodis* e *X. axonopodis* pv. *anacardii*
464 apresentaram-se estreitamente relacionados, sendo abrigados em um único grupo com
465 mais de 70% de similaridade (Fig. 4), conforme observado em estudos anteriores
466 (GAMA et al., 2011). Visto que *X. axonopodis* pv. *anacardii* foi relacionada ao
467 subgrupo 9.6 de *X. axonopodis* (AH-YOU et al., 2007; AH-YOU et al., 2009), estes
468 resultados indicam que os isolados pigmentados de *X. axonopodis* também pertencem a
469 este subgrupo. Interessantemente, das três linhas evolucionárias observadas neste grupo
470 de isolados, uma linha foi formada por isolados pigmentados de *X. axonopodis* e
471 isolados de *X. anacardii*, o que reforça o estreito relacionamento entre essas
472 fitobactérias. Resultados semelhantes foram observados para os isolados de *X.*
473 *axonopodis* pv. *passiflorae*, os quais foram divididos em duas linhas evolucionárias,
474 com uma delas sendo formada por dois isolados pigmentados e um isolado apigmentado
475 de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. Adicionalmente, os isolados de *X. axonopodis* pv.
476 *passiflorae* formaram um subgrupo que não se relacionou aos subgrupos 9.2, 9.5 e 9.6.
477 Neste estudo, devido à falta de isolados representativos dos subgrupos 9.1, 9.3 e 9.4,
478 não foi possível relacionar os isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* aos subgrupos
479 de *X. axonopodis sensu* Rademaker et al. (2005) por meio da técnica de rep-PCR.

480 A técnica de MLSA tem sido caracterizada como uma ferramenta robusta para
481 diferenciação de espécies de *Xanthomonas* spp. pelo fato de gerar grupos semelhantes
482 aqueles formados por meio de hibridação DNA-DNA (VAUTERIN et al., 1995), AFLP
483 (RADEMAKER et al., 2000), sequenciamento da região 16S rDNA (HAUBEN et al.,
484 1997) e rep-PCR (RADEMAKER et al., 2000; RADEMAKER et al., 2005). No
485 presente estudo, a técnica de MLSA foi utilizada de forma bem sucedida para
486 reconstruir a taxonomia do grupo *Xanthomonas* e demonstrar o posicionamento de *X.*
487 *campestris* pv. *viticola* e isolados pigmentados de *X. axonopodis* relacionados ao
488 cajueiro nos grupos 9.5 e 9.6 de *X. axonopodis*, respectivamente. Além disso, isolados
489 de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, os quais formaram um subgrupo não identificado por
490 meio das análises de rep-PCR, foram satisfatoriamente posicionados no subgrupo 9.4
491 juntamente com *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (ICMP5691).

492 Estudos anteriores realizados com a técnica de MLSA e o gênero *Xanthomonas*
493 demonstraram que as sequências parciais dos genes *dnaK* (chaperonina), *fyuA* (receptor
494 tonB-dependente), *gyrB* e *rpoD* foram altamente congruentes com a sequência
495 concatenada, sendo sugerido que um delineamento taxonômico mais robusto é
496 alcançado quando são utilizadas sequências com alto nível de congruência ao invés de
497 várias sequências com baixa congruência (YOUNG et al., 2008). No presente estudo, as
498 sequências parciais dos genes *gyrB* e *rpoD* foram altamente congruentes com a
499 sequência concatenada ($P=0,01$). No entanto, não foi possível concatenar as sequências
500 dos genes *gyrB*, *rpoD* e *hrpB*, as quais apresentaram elevado nível de incongruência
501 ($P=0,35$) com a sequência concatenada.

502 A árvore filogenética gerada com a sequência concatenada dos genes *gyrB* e
503 *rpoD* por meio de Inferência Bayesiana demonstrou claramente a existência de dois
504 grupos distintos dentro do gênero *Xanthomonas*, com valor de probabilidade posterior

505 acima de 99% apoiando essa divisão. Conforme sugerido anteriormente (HAUBEN et
506 al., 1997; YOUNG et al., 2008), estes resultados indicam que as espécies abrigadas no
507 grupo I (*X. albilineans*, *X. hyacinthi*, *X. theicola*, *X. translucens* e *X. sacchari*) e grupo
508 II (*X. arboricola*, *X. axonopodis*, *X. bromi*, *X. campestris*, *X. cassavae*, *X. citri*, *X.*
509 *codiae*, *X. cucurbitae*, *X. cynarae*, *X. fragariae*, *X. gardneri*, *X. hortorum*, *X. melonis*,
510 *X. oryzae*, *X. perforans*, *X. pisi*, *X. populi*, *X. vasicola* e *X. vesicatoria*) pertencem a
511 gêneros distintos, os quais se apresentaram estreitamente relacionados (Fig. 5).

512 As análises filogenéticas realizadas com a sequência concatenada dos genes
513 *gyrB* e *rpoD* (Fig 5) não detectaram as linhas evolucionárias observadas por meio da
514 técnica de rep-PCR (Fig. 4) dentro do grupo de isolados de *X. campestris* pv. *viticola*.
515 Resultado semelhante foi observado para os isolados pigmentados de *X. axonopodis* e
516 *X. axonopodis* pv. *anacardii*, indicando que mais estudos são necessários para
517 investigar a variabilidade intrapatovar destes táxons. Por outro lado, as duas linhas
518 evolucionárias detectadas entre os isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* por meio
519 da técnica de rep-PCR foram claramente reproduzidas. Interessantemente, uma linha
520 evolucionária foi formada tanto por isolados pigmentados quanto por isolados
521 apigmentados, sugerindo que, a coloração das colônias não reflete os níveis de
522 especiação desses isolados.

523 A interação entre fitobactérias e seus hospedeiros é fortemente influenciada por
524 nichos ecológicos, pela evolução do componente genético bacteriano e por proteínas de
525 resistência (proteínas R) presentes nos hospedeiros, as quais podem detectar a presença
526 de fitobactérias (CASTILHO; GREENBERG, 2007). O conhecimento das forças
527 evolucionárias agindo sobre uma determinada fitobactéria e sua população pode ser
528 obtido por meio do estudo de genes *housekeeping*, os quais estão menos sujeitos a
529 eventos de transferência horizontal. Por outro lado, altos níveis de discriminação podem

530 ser alcançados por meio da combinação de genes *housekeeping* com genes de
531 patogenicidade ou virulência, os quais apresentam maiores variações (PEREZ-
532 LOSADA et al., 2005). No entanto, visto que não foi observada congruência entre as
533 sequências dos genes *housekeeping* (*gyrB* e *rpoD*) e a sequência do gene de
534 patogenicidade (*hrpB*) utilizadas neste estudo, a variabilidade intrapatovar de *X.*
535 *campestris* pv. *viticola* e a variabilidade entre os isolados pigmentados de *X. axonopodis*
536 e *X. axonopodis* pv. *anacardii*, foram analisadas a partir da sequência parcial do gene
537 *hrpB*. Desta forma, a árvore filogenética gerada por meio de Inferência Bayesiana
538 permitiu uma satisfatória separação entre os isolados pigmentados de *X. axonopodis* e
539 os isolados de *X. axonopodis* pv. *anacardii* (Fig 6). Estes resultados sugerem que
540 podem existir diferenças substanciais quanto a gama de hospedeiros ou quanto à
541 agressividade a diferentes hospedeiros. No entanto, visto que estudos anteriores
542 demonstraram que isolados pigmentados de *X. axonopodis* e *X. axonopodis* pv.
543 *anacardii* apresentam-se igualmente agressivos ao cajueiro (GAMA et al., 2011), é
544 possível que estas diferenças só possam ser detectadas por meio de estudos
545 epidemiológicos conduzidos com uma ampla gama de hospedeiros.

546 Foi claramente demonstrado que *X. campestris* pv. *viticola* posiciona-se no
547 subgrupo 9.5 de *X. axonopodis*. Neste subgrupo estão abrigadas as subespécies de *X.*
548 *citri* e alguns patovares de *X. axonopodis* (RADEMAKER et al., 2005; YOUNG, et al,
549 2008; AH-YOU et el, 2009), tornando conflitante a classificação atual das espécies que
550 compõem este subgrupo. *X. campestris* pv. *viticola* mostrou-se estreitamente
551 relacionada a *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* (rep-PCR e MLSA) e a *X. citri*
552 subsp. *citri* (MLSA). Portanto, os resultados obtidos neste estudo apoiam a proposta
553 para reclassificação de *X. axonopodis* pv. *anacardii* e *X. axonopodis* pv.
554 *mangiferaeindicae* como patovares de *X. citri*. Conseqüentemente, sugere-se a

555 reclassificação de *X. campestris* pv. *viticola* como *X. citri* pv. *viticola* comb. nov. Por
556 sua vez, isolados pigmentados de *X. axonopodis* apresentaram-se estreitamente
557 relacionados a *X. axonopodis* pv. *anacardii*, a qual foi posicionada no subgrupo 9.6 de
558 *X. axonopodis* (AH-YOU et al., 2007; AH-YOU et al., 2009). Portanto, essas
559 fitobactérias devem ser classificadas no mesmo patovar, com os isolados pigmentados
560 de *X. axonopodis*, sendo classificados provisoriamente como *X. axonopodis* pv.
561 *anacardii* var. nov. *pigmentatus*.

562

563 **Agradecimentos**

564 A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
565 (FACEPE), pela bolsa de Doutorado concedida a M. A. S. Gama e ao Conselho
566 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de
567 produtividade aos pesquisadores E. B. Souza e R. L. R. Mariano.

568

569 **Literatura Citada**

- 570 1. Ah-You, N., Gagnevin, L., CHIROLEU, F., JUEN, E., Rodrigues Neto, J. e
571 Pruvost, O. 2007. Pathological variations within *Xanthomonas campestris* pv.
572 *mangiferaeindicae* supported its separation into three distinct pathovars that can
573 be distinguished by amplified fragment length polymorphism. *Phytopathology*
574 97: 1568-1577.
- 575 2. Ah-You, N.; Gagnevin, L.; Grimont, P. A. D.; Brisse, S.; Nesme, X.; Chiroleu,
576 F.; Bui Thi Ngoc, L.; Juen, E.; Lefeuvre, P.; Vernière, C. e Pruvost, O. 2009.
577 Polyphasic characterization of xanthomonads pathogenic to members of the
578 Anacardiaceae and their relatedness to species of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst.*
579 *Evol. Microbiol.* 59: 306-318.

- 580 3. Araujo, J. S. P. 2001. Perfil epidemiológico e subsídios para o controle de
581 *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, agente do cancro
582 bacteriano da videira (*Vitis vinifera*) no Brasil. 2001. Ph.D. Tese, Universidade
583 Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- 584 4. Araujo, J. S. P., Reis Júnior, F. B., Cruz, G. B., Oliveira, B. C., Robbs, C. F.,
585 Ribeiro, R. L. D. e Polidoro, J. C. 2005. Produção e caracterização de anticorpos
586 policlonais contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Pesq. Agropec. Bras.*
587 40: 305-309.
- 588 5. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de
589 Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 20 de 27 de setembro de 2001.
590 Aprova as diretrizes para a produção integrada de frutas – DGPIF e as normas
591 técnicas gerais para a produção integrada de frutas. Acesso em 03 de novembro
592 de 2009 em
593 [http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operac](http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=3915)
594 [ao=visualizar&id=3915](http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=3915).
- 595 6. Bull, C. T., De Boer, S. H., Denny, T. P., Firrao, G., Fischer-Le Saux, M.,
596 Saddler, G. S., Scortichini, M., Stead, D. E. e Takikawa, Y. 2010.
597 Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980-2007. *J. Plant*
598 *Pathol.* 92: 551-592.
- 599 7. Bull, C. T.; De Boer, S. H.; Denny, T. P.; Firrao, G.; Fischer-Le SAUX, M.;
600 SaddleR, G. S.; Scortichini, M.; Stead, D. E.; Takikawa, Y. 2012. List of new
601 names of plant pathogenic bacteria (2008-2010). *J. Plant Pathol.* 94: 21-27.
- 602 8. Castillo, J. A. e Greenberg, J. T. 2007. Evolutionary dynamics of *Ralstonia*
603 *solanacearum*. *Appl. and Environ. Microbiol.* 73: p. 1225-1238.

- 604 9. Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D. e Rambaut, A. 2012. Bayesian
605 phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* 29: 1969–
606 1973.
- 607 10. Edgar, R. C. 2004. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy
608 and high throughput. *Nucleic Acid Research* 25: 1792-1797.
- 609 11. Ferreira-Tonin, M. Caracterização taxonômica de espécies do gênero
610 *Xanthomonas*. 2012. Ph.D. Tese, Universidade Estadual de Campinas,
611 Campinas, São Paulo.
- 612 12. Ferreira-Tonin, M., Corrêa, D. B. A. e Destéfano, S. A. L. 2011. Classificação
613 de linhagens de *Xanthomonas* sp. por multilocus sequence analysis (MLSA) e
614 Hibridização DNA-DNA. *Trop. Plant Pathol.* 36: 128.
- 615 13. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. Roma.
616 Acesso em 20 de janeiro de 2014 em [http://faostat3.fao.org/faostat-](http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E)
617 [gateway/go/to/download/Q/QC/E](http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E).
- 618 14. Gama, M. A. S., Mariano, R. L. R., Viana, F. M. P., Ferreira, M. A. S. V. e
619 Souza, E. B. 2011. Polyphasic characterization of pigmented strains of
620 *Xanthomonas* pathogenic to cashew trees. *Plant Dis.* 95: 793-802.
- 621 15. Gagnevin, L.; Pruvost, O. 2001. Epidemiology and control of mango bacterial
622 black spot. *Plant Dis.* 85: 928-935.
- 623 16. Guindon, S. and Gascuel, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to
624 estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52: 696–704.
- 625 17. Guimarães, T. G. 2007. Visita técnica ao pólo frutícola do Vale do São
626 Francisco, em Petrolina, PE e Juazeiro, BA. Empresa Brasileira de Pesquisa
627 Agropecuária (EMBRAPA CERRADOS), Planaltina, Documentos No 201.

- 628 18. Hampl, V., Pavlicek, A. e Flegr, J. 2001. Construction and bootstrap analysis of
629 DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program
630 FreeTree: application to trichomonad parasites. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:
631 731-735.
- 632 19. Hauben, L., Vauterin, L., Swings, J. e Moore, E. R. B. 1997. Comparison of 16S
633 ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*
634 57: 328-335.
- 635 20. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. SIDRA. Rio de Janeiro. Acesso
636 em 11 de novembro de 2013 em
637 <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1613&z=p&o=18&i=P>.
- 638 21. Instrução Normativa SDA N° 59, de 20 de dezembro de 2007. Diário Oficial Da
639 União, Brasília, 21 de dezembro de 2007, seção 1, p. 49.
- 640 22. Lazzarotto, J. J. e Fioravanço, J. C. 2013. Tendências e sazonalidades nas
641 exportações e importações brasileiras de uva de mesa. *Inf. Econ.* 43: 43-58.
- 642 23. Leite Jr., R. p., Minsavage, G. V. Bonas, U. e Stall, R. E. 1994. Detection and
643 identification of phytopathogenic *Xanthomonas* strains by amplification of DNA
644 sequences related to the *hrp* genes of *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*.
645 *Appl. and Environ. Microbiol.* 60: 1068-1077.
- 646 24. Lopes, P. R. C., Oliveira, I. V. M. e Silva, R. R. S. Avaliação do potencial de
647 produção de frutas de clima temperado no Nordeste Brasileiro. In: Semana
648 internacional da fruticultura, floricultura e agroindústria, 16, 2009, Fortaleza.
649 Ceará, Instituto Frutal.
- 650 25. Louws, E. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T. e Bruijn, F. J. 1994. Specific
651 genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas*

- 652 pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. Appl. and
653 Environ. Microbiol. 60: 2286-2295.
- 654 26. Marques, E. 2007. Variabilidade e tolerância ao cobre em *Xanthomonas*
655 *campestris* pv. *viticola* agente causal do cancro bacteriano da videira *Vitis* spp.
656 Ms.C. Dissertação, Universidade de Brasília, Brasília.
- 657 27. Nayudu, M. V. 1972. *Pseudomonas viticola* sp. nov., incitant of a new bacterial
658 disease of grapevine. Phytopath. Z. 73: 183-186.
- 659 28. Pavlicek, A., Hrdá, S. e Flegr, J. 1999. FreeTree – freeware program for
660 contruction of phylogenetic trees on the basis of distance data and
661 bootstrap/jackknife analysis of the robustness. Application in the RAPD analysis
662 of genus *Frekelia*. Folia Biol. 45: 97-99.
- 663 29. Perez-Losada, M., Viscidi, R. P., Demma, J. C., Zenilman, J. e Crandall, K. A.
664 2005. Population genetics of *Neisseria gonorrhoeae* in a high-prevalence
665 community using a hypervariable outer membrane *porB* and 13 slowly evolving
666 housekeeping genes. Mol. Biol. Evol. 22: 1887–1902.
- 667 30. Posada, D. 2008. JModelTest: phylogenetic model averaging. Mol. Ecol. Notes
668 6: 288-295.
- 669 31. Rademaker, J. L. W., Hoste, B., Louws, F. J., Kersters, K., Swings, J., Vauterin,
670 L., Vauterin, P. e Bruijn, F. L. 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR
671 genomic fingerprinting with DNA- DNA homology studies: *Xanthomonas* as a
672 model system. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 665-677.
- 673 32. Rademaker, J. L. W., Louws, F. J., Schultz, M. H., Rossbach, U., Vauterin, L.,
674 Swings, J. e Bruijn, F. J. 2005. A comprehensive species to strain taxonomic
675 framework for *Xanthomonas*. Phytopathology 95: 1098-1111.

- 676 33. Rambaut, A. e Drummond, A. J. 2007. Tracer v1.4. Disponível em:
677 <<http://beast.bio.uk/Tracer>>
- 678 34. Staden, R., Beal, K. F. e Bonfield, J. K. 1998. The Staden package. In: Misener
679 S. e Krawetz, S. A. (eds) Bioinformatics methods and protocols. Humana, New
680 York, p. 115–130.
- 681 35. Sowfford, D.L. 2002. Paup*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other
682 methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- 683 36. Takita, M. A., Borges, K. M., Reis, M. S. e Destéfano, S. A. L. Analysis of
684 genomic sequences of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* gives support to a
685 taxonomic reclassification. In: Reunião Annual da Sociedade Brasileira de
686 Bioquímica e Biologia Molecular, XXXV, 2006, Águas de Lindóia. Abstracts...
687 São Paulo, Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular.
- 688 37. Takita, M. A.; Souza, A.; Borges, K. M.; Coleta-Filho, H. D.; Rodrigues Neto,
689 J.; Machado, M. A. A região *rpf* (regulation of pathogenicity factors) distingue
690 espécies de *Xanthomonas*. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 29, p. 254, 2004.
- 691 38. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G. e Nei M. 2011. MEGA5:
692 molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood,
693 evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 28:
694 2731–2739.
- 695 39. Trindade, L. C., Lima, M. F. e Ferreira, M. A. S. V. 2005. Molecular
696 characterization of Brazilian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* by
697 rep-PCR fingerprinting. Fitopatol. Bras. 30: 46-54.
- 698 40. Trindade, L. C., Marques, E., Lopes, D. B. e Ferreira, M. A. S. V. 2007.
699 Development of a molecular method for detection and identification of
700 *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. Summa Phytopathol. 33: 16-23.

- 701 41. Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K. e Swings, J. 1995. Reclassification of
702 *Xanthomonas*. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 472-489.
- 703 42. Viana, F. M. P.; Ferreira; M. A. S. V.; Mariano; R. L. R.; Saraiva; H. Á. O.;
704 Trindade; L. C. Mancha-de-Xanthomonas: nova doença do cajueiro. Fortaleza:
705 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2006. 18p. (EMBRAPA, Boletim
706 de Pesquisa e Desenvolvimento, 24).
- 707 43. Young, J. M.; Bradbury, J. F.; Panagopoulos, C. G.; Robbs, C. F. 1978. A
708 proposed nomenclature and classification for pathogenic bacteria. N. Z. J. Agric.
709 Res., 21: 153-177.
- 710 44. Young, J. M., Park, D. C., Shearman, H. M. e Fargier, E. 2008. A multilocus
711 sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. Syst. Appl. Microbiol. 31: 366-
712 377.

Tabela 1. Descrição dos isolados de *Xanthomonas* utilizados neste estudo

Código^y	Espécie/patovar	Hospedeiro	Ano/origem
IBSBF1967	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i>	<i>Vitis vinifera</i>	1972 Índia
Xcv8	<i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i>	<i>V. vinifera</i>	2008 Brasil (PE)
Xcv90	<i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i>	<i>V. vinifera</i>	2009 Brasil (BA)
Xcv79	<i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i>	<i>V. vinifera</i>	2009 Brasil (PE)
Xcv76	<i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i>	<i>V. vinifera</i>	2009 Brasil (PE)
Xcv68	<i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i>	<i>V. vinifera</i>	2009 Brasil (BA)
Xcv55	<i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i>	<i>V. vinifera</i>	2009 Brasil (BA)
Xcv18	<i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i>	<i>V. vinifera</i>	2009 Brasil (PE)
Xcv13	<i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i>	<i>V. vinifera</i>	2009 Brasil (PE)
Xcv117	<i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i>	<i>V. vinifera</i>	2009 Brasil (PE)
Xcv108	<i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i>	<i>V. vinifera</i>	2009 Brasil (PE)
Xcv156	<i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i>	<i>V. vinifera</i>	2010 Brasil (PE)
Xcv178	<i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i>	<i>V. vinifera</i>	2011 (Brasi (BA)
Xcv142	<i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i>	<i>V. vinifera</i>	2010 Brasil (BA)
Xcv202	<i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i>	<i>V. vinifera</i>	2011 Brasil (PE)
Xcv229	<i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i>	<i>V. vinifera</i>	2012 Brasil (BA)
CAST2	<i>Xanthomonas axonopodis</i> ^z	<i>Anacardium occidentale</i>	2008 Brasil (PI)
CCP76	<i>X. axonopodis</i> ^z	<i>A. occidentale</i>	2006 Brasil (CE)
Taq3	<i>X. axonopodis</i> ^z	<i>A. occidentale</i>	2009 Brasil (SP)
Taq9	<i>X. axonopodis</i> ^z	<i>A. occidentale</i>	2009 Brasil (SP)
Taq10	<i>X. axonopodis</i> ^z	<i>A. occidentale</i>	2009 Brasil (SP)
Taq13	<i>X. axonopodis</i> ^z	<i>A. occidentale</i>	2009 Brasil (SP)
Taq18	<i>X. axonopodis</i> ^z	<i>A. occidentale</i>	2009 Brasil (SP)
Xcmf1	<i>X. axonopodis</i> ^z	<i>A. occidentale</i>	2008 Brasil (PI)
Xcmf2	<i>X. axonopodis</i> ^z	<i>A. occidentale</i>	2008 Brasil (PI)
PC2	<i>X. axonopodis</i> ^z	<i>A. occidentale</i>	2009 Brasil (PI)
IBSBF2579	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>anacardii</i>	<i>A. occidentale</i>	Brasil
IBSBF1508	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>anacardii</i>	<i>A. occidentale</i>	Brasil

IBSBF1971	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>anacardii</i>	<i>A. occidentale</i>	Brasil
IBSBF657	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>anacardii</i>	<i>M. indicae</i>	1988 Brasil
IBSBF2586	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i>	<i>Mangiferae indicae</i>	Índia
Xap	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> ^z	<i>Passiflora edulis</i>	Brasil
IBSBF960	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>	<i>P. edulis</i>	1992 Brasil
IBSBF1007	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>	<i>P. edulis</i>	1993 Brasil
IBSBF1343	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> ^z	<i>P. edulis</i>	1967 Brasil
IBSBF959	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> ^z	<i>Brassica napus</i>	1992 Brasil
UnB824	<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> ^z	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1991 Brasil
IBSBF1733	<i>X. citri</i> subsp. <i>malvacearum</i> ^z	<i>Gossypium</i> sp.	1958 Sudão
Pst	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>L. esculentum</i>	1982 EUA

^y IBSBF1967 (isolado patótipo) = ICMP3867, LMG965 e NCPPB2475; IBSBF2579 = ICMP4088; IBSBF2586 = ICMP5740, LMG941, NCPPB490 e ATCC11637; IBSBF959 = ICMP12188; IBSBF960 = ICMP12189; IBSBF1343 (isolado patótipo) = IMCP3151, LMG810 e NCPPB2346; IBSBF1733 (isolado patótipo) = ICMP5739 e LMG761; UnB824 = IBSBF905. IBSBF: Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (São Paulo, Brasil); ICMP: International Collection of Microorganisms from Plants, (Auckland, New Zealand); LMG: Belgian Coordinated Collections of Micro-organisms (Ghent, Belgium); NCPPB: National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (York, United Kingdom); UnB: Coleção de Bactérias Fitopatogênicas do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília (Distrito Federal, Brasil). Xcv = isolados de *X. campestris* pv. *viticola* da Coleção de Culturas do Laboratório de Fitobacteriologia (LAFIBAC) (Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Pernambuco, Brasil).

^z Isolados pigmentados.

Tabela 2: Perfil metabólico das espécies e patovares de *Xanthomonas* utilizadas neste estudo, determinado pelo sistema Biolog GenIII

Testes bioquímicos	<i>Xanthomonas</i>		Isolados			<i>Xanthomonas</i>		<i>Pseudomonas</i>	
	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pigmentados de	<i>Xanthomonas</i>	<i>Xanthomonas</i>	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	<i>Xanthomonas</i>	<i>syringae</i>
	<i>campestris</i>	pv.	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	<i>axonopodis</i>	pv.	<i>citri</i> subsp.	pv.	<i>vesicatoria</i>
	pv. <i>viticola</i>	<i>passiflorae</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>anacardii</i>	<i>mangiferae</i>	<i>malvacearum</i>	<i>campestris</i>	<i>vesicatoria</i>	<i>tomato</i>
ácido L-Málico	+ ^x	+	+	+	+	+	+	+	+
ác. Acético	94	+	+	+	-	+	+	-	+
ác. acetoacético	71	25	11	75	-	+	+	-	-
ác. bromosuccínico	94	+	78	50	-	+	+	-	-
ác. cítrico	+	+	+	+	-	+	+	+	+
ác. D-aspártico	-	-	-	-	-	+	-	-	-
ác. D-galacturônico	88	+	89	50	+	+	+	+	+
ác. D-glucônico	6	-	11	-	-	+	-	-	+
ác. D-glucurônico	76	+	33	25	+	+	+	+	+
ác. D-lático metil ester	12	-	11	50	-	+	-	-	-
ác. D-málico	-	-	-	-	-	+	+	-	-
ác. D-sacárico	18	-	78	75	-	+	+	-	-
ác. fórmico	-	-	11	25	-	+	+	-	+

ác. fusídico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ác. L-aspártico	76	+	+	-	+	+	+	+	-	+
ác. L-galactônico lactona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ác. L-glutâmico	88	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ác. L-lático	12	-	22	+	-	+	+	+	+	+
ác. L-piroglutâmico	6	-	-	-	-	+	-	-	-	+
ác. múcico	12	-	11	25	-	+	+	-	-	-
ác. N-acetilgalactosamina	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
ác. N-acetilneuramínico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ác. Nalidíxico	18	-	-	-	-	-	+	-	-	+
ác. p-hidroxifenilacético	6	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ác. Propiônico	88	50	78	+	-	+	+	-	-	+
ác. quínico	6	-	-	-	-	+	-	-	-	+
ác. α -ceto-glutárico	+	75	56	+	+	+	+	+	+	+
ác. α -ceto-butírico	82	50	56	75	-	+	+	-	-	-
ác. α -hidroxibutírico	18	-	22	-	-	+	+	-	-	-
ác. β -D,L-hidroxibutírico	18	25	-	-	-	+	+	-	-	+
ác. γ -aminobutírico	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+

aztreonam	53	50	-	50	-	-	-	-	+
Azul de tetrazólio	94	+	89	+	-	+	+	+	+
Bromato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Butirato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Cloreto de Lítio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabitol	-	-	22	-	-	+	-	-	-
D-celobiose	+	75	+	+	+	+	+	+	-
dextrina	94	75	+	+	+	+	+	+	-
D-frtose-6-fosfato	82	+	56	50	-	+	+	-	+
D-frutose	+	75	+	+	+	+	+	+	+
D-fucose	6	-	22	-	-	+	+	-	+
D-galactose	+	75	+	+	+	+	+	+	+
D-glicose-6-fosfato	53	75	44	50	+	+	+	+	-
D-maltose	76	75	+	75	-	+	+	+	-
D-manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-manose	+	75	89	+	+	+	+	+	-
D-melobiose	88	25	33	+	+	+	+	+	-
D-rafinose	41	25	-	25	-	-	+	+	-

D-salicina	18	-	11	-	-	+	-	+	-
D-serina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-serina	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D-sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-trealose	+	75	+	+	+	+	+	+	-
D-turanose	12	-	11	-	+	+	-	-	-
α -D-lactose	-	-	44	-	+	+	-	-	-
Estaquiose	6	-	-	-	-	-	-	-	-
gelatina	88	+	33	+	-	+	+	+	-
gentiobiose	+	25	+	25	+	+	+	+	-
glicerol	71	25	89	+	+	+	-	+	-
glicil-L-prolina	82	25	78	+	-	+	+	+	+
glucuronamida	94	+	33	25	+	+	+	+	+
HCl Guanidina	-	-	-	-	-	-	-	-	+
inosina	24	-	33	+	-	+	-	+	-
lactato de sódio 1%	88	+	89	+	-	+	+	-	+
L-alamina	41	-	67	50	+	+	+	-	+
L-arginina	6	-	-	-	-	+	-	+	+

L-fucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-histidina	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lincomicina	88	+	78	+	-	+	+	+	+	+
L-ramnose	12	-	-	25	+	+	-	-	-	-
L-serina	88	75	89	+	-	+	+	+	+	+
Metil Piruvato	82	+	67	+	-	+	+	-	-	-
Minociclina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
mio-isonitol	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
N-acetil-beta-D- manosamina	24	25	33	25	+	+	-	+	-	-
N-acetil-D-glicosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
NaCl 1%	+	+	89	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 4%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
NaCl 8%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Niaproof 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
pectina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ph 5	59	-	11	+	-	-	-	-	-	+
pH 6	+	75	+	+	+	+	-	+	+	+

rifamicina SV	82	75	-	+	-	+	+	-	+
sacarose	+	75	+	+	+	+	+	+	-
Telurito de potássio	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Tetrazólio Violeta	6	-	-	75	-	-	-	-	+
trimetil glicose	12	50	11	-	+	+	-	-	-
Troleandomicina	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Tween 40	+	75	78	+	+	+	+	+	+
Vancomicina	6	-	-	-	-	-	-	-	+
α -D-glicose	+	75	+	+	+	+	+	+	+
β -metil D-glicosídeo	-	-	-	-	-	+	-	-	-
h^y	0.82	0.84	0.81	0.86	ND	ND	ND	ND	ND

^x + = 100% de reações positivas; - = 100% de reações negativas. Valores numéricos representam o percentual de reações positivas.

^z h = Índice de homogeneidade metabólica: variando de 1, quando o grupo é perfeitamente consistente, ou seja, todos os isolados exibem a mesma reação para a característica fenotípica estudada, a 0, quando 50% dos isolados são positivos para cada característica (VAUTERIN et al. 2995). ND = Não determinado.

Tabela 3: Caracterização epidemiológica de manchas foliares causadas por isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae*, *X. axonopodis* pv. *anacardii* e isolados pigmentados de *X. axonopodis* artificialmente inoculados em cajueiros clone CCP76

Isolado ^v	Período de incubação ^w (dias)	Severidade ^x (mm)
IBSBF1967	3,0 b ^y	1,5 f
Xcv55	4,0 a	3,8 e
Xcv68	3,0 b	4,0 e
Xcv108	4,0 a	3,7 e
Xcv178	3,0 b	3,5 e
IBSBF2586	2,8 b	4,0 e
IBSBF657	3,4 b	4,2 e
IBSBF1508	4,3 a	4,0 e
IBSBF2579	2,6 b	5,2 c
Taq 3	3,0 b	4,9 d
Taq 9	2,5 b	5,8 b
Taq 13	2,5 b	6,9 a
XcmF1	2,6 b	7,4 a
XcmF2	3,2 b	4,3 e
CV ^z (%)	16,8	9,5

^v IBSBF1967, Xcv55, Xcv68, Xcv108 e Xcv178 = Isolados de *X. campestris* pv. *viticola*; IBSBF2586 = *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae*; IBSBF657, IBSBF 1508 e IBSBF2576 = *X. axonopodis* pv. *anacardii*; Taq3, Taq9, Taq13, XcmF1 e XcmF2 = Isolados pigmentados de *X. axonopodis*.

^w Período de incubação: número de dias a partir da inoculação até o surgimento do primeiro sintoma.

^x Severidade: avaliada por meio da medição das lesões aos 23 dias após as inoculações.

^y Média de oito repetições. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não apresentaram diferenças significativas pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0.05$).

^z CV: coeficiente de variação.

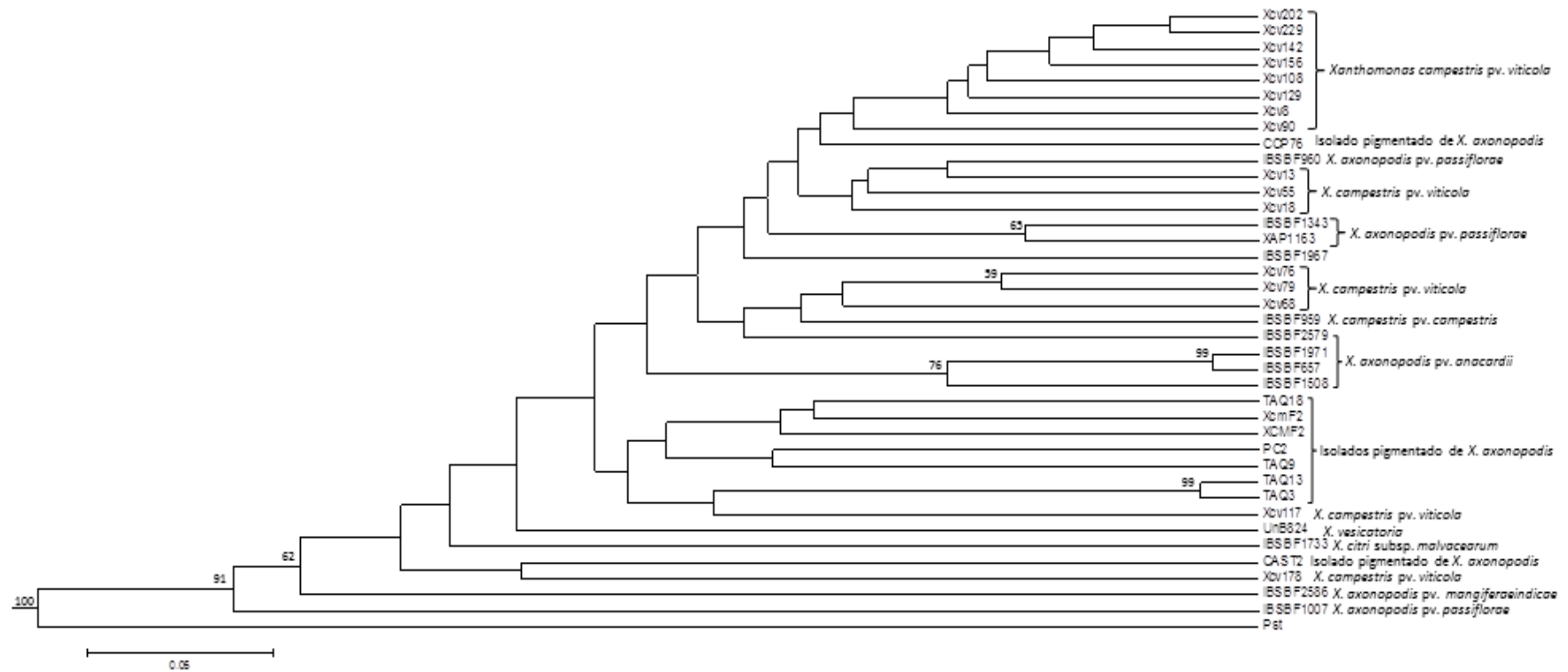


Fig. 1: Dendrograma baseado no método UPGMA de acordo com os perfis gerados por meio de 94 características fenotípicas mostrando as relações metabólicas entre as espécies e patovares de *Xanthomonas* utilizadas neste estudo. A barra indica 4% de diferença nos perfis metabólicos. Valores de *bootstrap* menores do que 50% não são mostrados nos ramos.

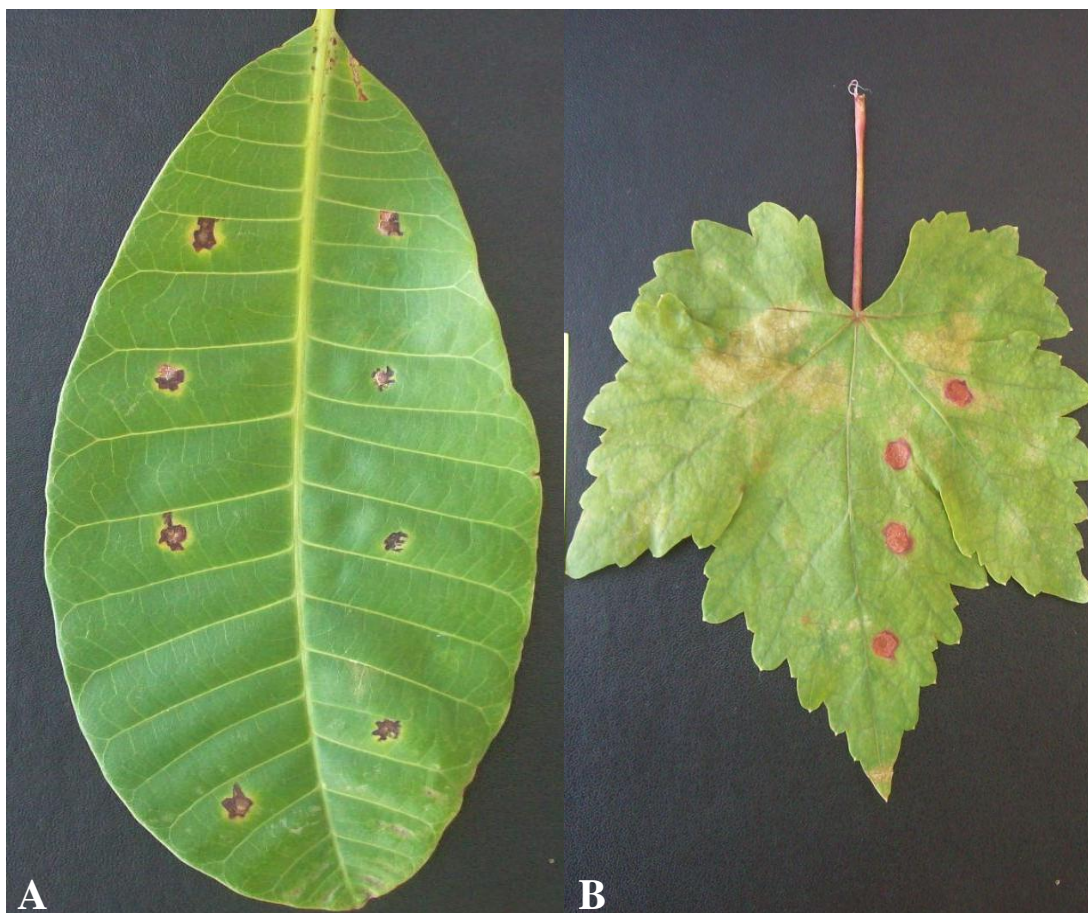


Fig 2. Lesões causadas por isolados pigmentados de *X. axonopodis* (face foliar esquerda) e *X. campestris* pv. *viticola* (face foliar direita). **A.** Folhas de cajueiro e; **B.** Folhas de videira.

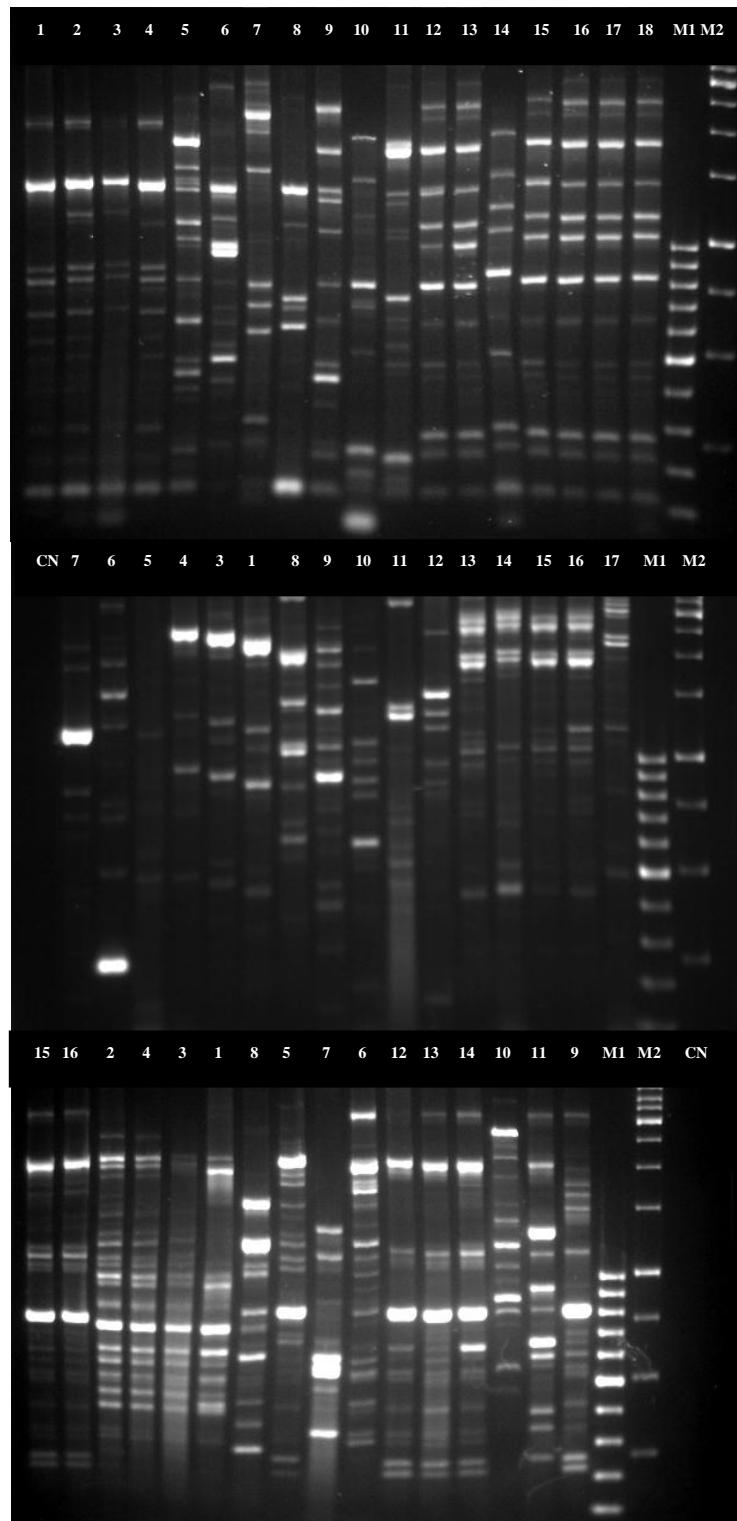


Fig. 3. Análise eletroforética dos fragmentos gerados por meio de REP (A), ERIC (B) e BOX-PCR (C) dos isolados de *Xanthomonas* utilizados neste estudo. 1 – 4 = Isolados pigmentados (1 e 2) e apigmentados (3 e 4) de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*; 5 = *X. citri* pv. *malaccarum*; 6 = *X. vesicatoria*; 7 = *P. syringae* pv. *tomato*; 8 – *X. campestris* pv. *campestris*; 9 = *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae*; 10 = *X. axonopodis* pv. *anacardii*; 11 = isolado pigmentado de *X. axonopodis* e; 12 – 18 = *X. campestris* pv. *viticola*; CN = controle negativo; M1 = Marcador 100 pb DNA Ladder; M2 = Marcador 1 kb DNA Ladder.

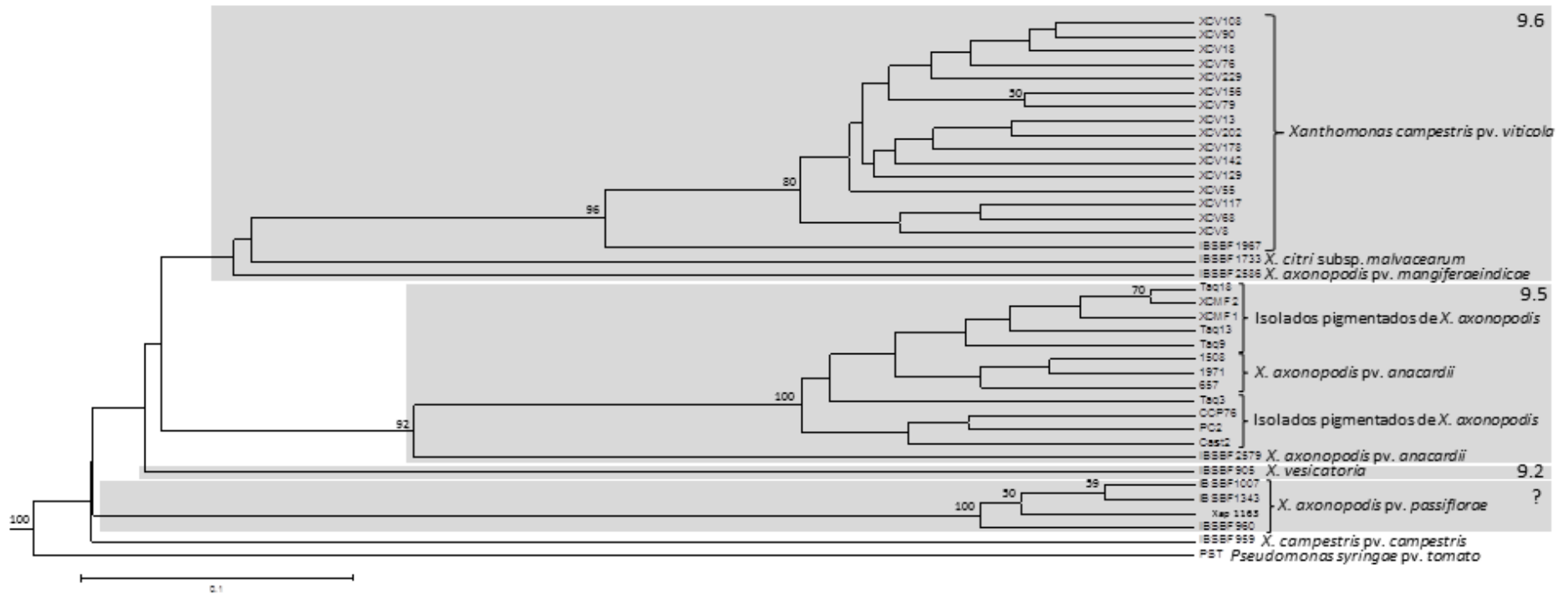


Fig. 4. Dendrograma baseado no método UPGMA de acordo com os perfis gerados por meio de rep-PCR mostrando as relações genômicas entre as espécies e patovares de *Xanthomonas* utilizadas nestes estudo. A barra indica 5% de diferença nos perfis genômicos. O posicionamento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e dos isolados pigmentados *X. axonopodis* nos grupos 9.6 e 9.5 *sensu* Rademaker et al. (2005) é mostrado. Valores de abaixo de 50% de *bootstrap* não são mostrados nos ramos.

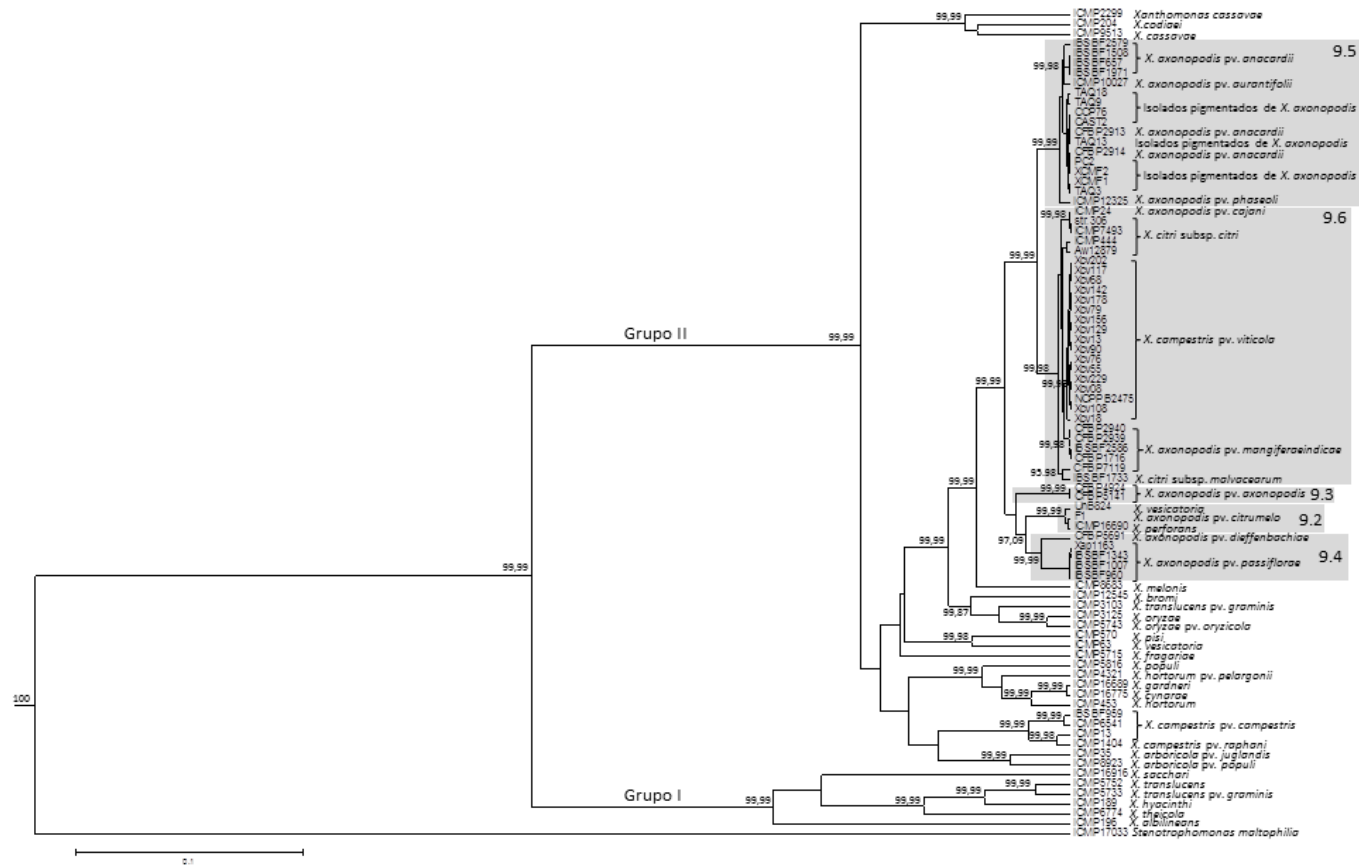


Fig. 5. Árvore filogenética construída por meio de Inferência Bayesiana a partir das seqüências parciais dos genes *gyrB* e *rpoD*. O posicionamento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e dos isolados pigmentados *X. axonopodis* nos grupos 9.6 e 9.5 *sensu* Rademaker et al. (2005) é mostrado. A barra indica o número de substituições por sítio. NCPPB 2475 = IBSBF1967. O posicionamento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e dos isolados pigmentados *X. axonopodis* nos grupos 9.6 e 9.5 *sensu* Rademaker et al. (2005) é mostrado. Valores de abaixo de 95% de probabilidade posterior não são mostrados nos ramos.

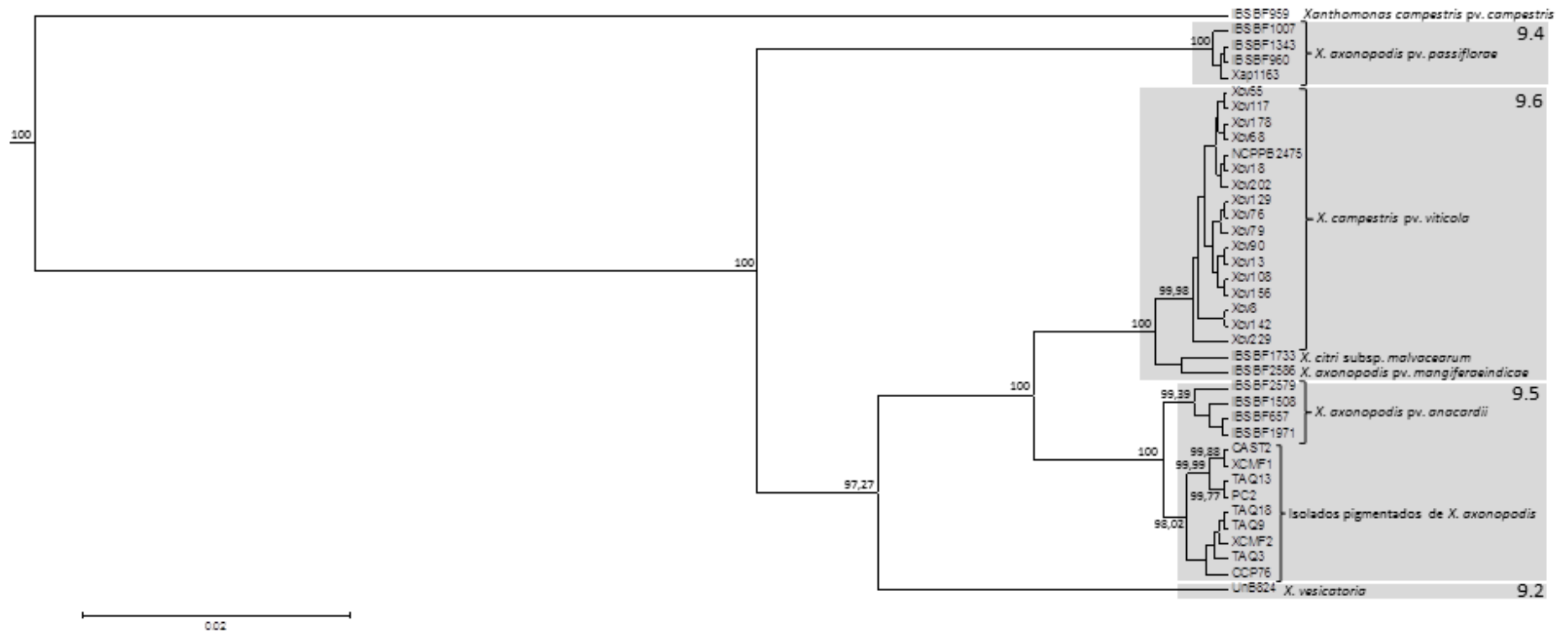


Fig. 6. Árvore filogenética construída por meio de inferência bayesiana a partir da sequência parcial do gene *hrpB*. NCPPB 2475 = IBSBF1967. O posicionamento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e dos isolados pigmentados *Xanthomonas axonopodis* nos grupos 9.6 e 9.5 *sensu* Rademaker et al. (2005) e a separação entre isolados pigmentados de *X. axonopodis* e *X. axonopodis* pv. *anacardii* são mostrados. A barra indica o número de substituições por sítio. Valores de abaixo de 95% de probabilidade posterior não são mostrados nos ramos.

Tabela 1 suplementar: Sequências parciais dos genes *gyrB* e *rpoD* de isolados de *Xanthomonas* spp. obtidas no GenBank

Códigos	Isolado	ID sequência (<i>gyrB</i>)	ID sequência (<i>rpoD</i>)
ICMP 17033	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> *	gi 188090461 gb EU499066.1	gi 188090701 gb EU499186.1
ICMP 196	<i>Xanthomonas albilineans</i> *	gi 188090255 gb EU498963.1	gi 188090493 gb EU499082.1
ICMP 35	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> *	gi 188090469 gb EU499070.1	gi 188090469 gb EU499070.1
ICMP 8923	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>populi</i> **	gi 188090399 gb EU499035.1	gi 188090639 gb EU499155.1
CFBP2913	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>anacardii</i>	gi 355348331 HQ591222.1	gi 258488889 gb FJ561622.1
CFBP2914	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>anacardii</i>	gi 355348333 gb HQ591223.1	gi 258488891 gb FJ561623.1
ICMP 10027	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i> *	gi 188090421 gb EU499046.1	gi 188090661 gb EU499166.1
CFBP5141	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>axonopodis</i>	gi 355348385 gb HQ591249.1	gi 258488939 gb FJ561647.1
CFBP4924	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>axonopodis</i>	gi 355348383 gb HQ591248.1	gi 258488937 gb FJ561646.1
ICMP 444	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>cajani</i> **	gi 188090275 gb EU498973.1	gi 188090513 gb EU499092.1
ICMP7493	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	gi 188090377 EU499024.1	gi 188090615 gb EU499143.1
str. 306	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	gi 21240769 gb AE008923.1	gi 21240769 AE008923.1
ICMP24	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> **	gi 188090229 EU498950.1	gi 188090467 gb EU499069.1
F1	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citrumelo</i>	gb CP002914.1 :5020-7464	gi 346647687 gb CP002914.1

CFBP5691	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>dieffenbachiae</i>	gi 355348401 gb HQ591257.1	gi 258488957 gb FJ561656.1
CFBP7119	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	gi 355348511 gb HQ591312.1	gi 258489073 gb FJ561714.1
CFBP1716	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i>	gi 355348293 HQ591203.1	gi 258488851 gb FJ561603.1
CFBP2940	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i>	gi 355348343 HQ591228.1	gi 258488901 gb FJ561628.1
CFBP2939	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i>	gi 355348341 gb HQ591227.1	gi 258488899 gb FJ561627.1
ICMP 12325	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	gi 188090431 gb EU499051.1	gi 188090671 gb EU499171.1
ICMP 12545	<i>Xanthomonas bromi</i> *	gi 188090433 gb EU499052.1	gi 188090673 gb EU499172.1
ICMP 6451	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	gi 188090365 EU499018.1	gi 188090603 EU499137.1
ICMP 13	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> *	gi 188090225 gb EU498948.1	gi 188090463 gb EU499067.1
ICMP 1404	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>raphani</i> **	gi 188090293 gb EU498982.1	gi 188090531 gb EU499101.1
ICMP 204	<i>Xanthomonas cassavae</i> *	gi 188090259 gb EU498965.1	gi 188090497 gb EU499084.1
Aw12879	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	gi 471209079 gb CP003778.1	gi 471209079 CP003778.1
ICMP 9513	<i>Xanthomonas codiaei</i> *	gi 188090405 gb EU499038.1	gi 188090645 gb EU499158.1
ICMP 2299	<i>Xanthomonas cucurbitae</i> *	gi 188090307 gb EU498989.1	gi 188090545 gb EU499108.1
ICMP 16775	<i>Xanthomonas cynarae</i> *	gi 188090451 gb EU499061.1	gi 188090691 gb EU499181.1
ICMP 5715	<i>Xanthomonas fragariae</i> *	gi 188090329 gb EU499000.1	gi 188090567 gb EU499119.1
ICMP 16689	<i>Xanthomonas gardneri</i> *	gi 188090445 gb EU499058.1	gi 188090685 gb EU499178.1
ICMP4321	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i> **	gi 188090321 gb EU498996.1	gi 188090559 gb EU499115.1

ICMP 453	<i>Xanthomonas hortorum</i> *	gi 188090279 gb EU498975.1	gi 188090517 gb EU499094.1
ICMP 189	<i>Xanthomonas hyacinthi</i> *	gi 188090249 gb EU498960.1	gi 188090487 gb EU499079.1
ICMP 8683	<i>Xanthomonas melonis</i>	gi 188090393 gb EU499032.1	gi 188090633 gb EU499152.1
ICMP 5743	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	gi 188090343 gb EU499007.1	gi 188090581 gb EU499126.1
ICMP 3125	<i>Xanthomonas oryzae</i> *	gi 188090315 gb EU498993.1	gi 188090553 gb EU499112.1
ICMP 16690	<i>Xanthomonas perforans</i> *	gi 188090447 gb EU499059.1	gi 188090687 gb EU499179.1
ICMP 570	<i>Xanthomonas pisi</i> *	gi 188090281 gb EU498976.1	gi 188090519 gb EU499095.1
ICMP 5816	<i>Xanthomonas populi</i> *	gi 188090357 gb EU499014.1	gi 188090595 gb EU499133.1
ICMP 16916	<i>Xanthomonas sacchari</i> *	gi 188090455 gb EU499063.1	gi 188090695 gb EU499183.1
ICMP 6774	<i>Xanthomonas theicola</i> *	gi 188090369 gb EU499020.1	gi 188090607 gb EU499139.1
ICMP 5733	<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>graminis</i> **	gi 188090337 gb EU499004.1	gi 188090575 gb EU499123.1
ICMP 5752	<i>Xanthomonas translucens</i> *	gi 188090347 gb EU499009.1	gi 188090585 gb EU499128.1
ICMP 3103	<i>Xanthomonas vasicola</i> *	gi 188090313 gb EU498992.1	gi 188090551 gb EU499111.1
ICMP 63	<i>Xanthomonas vesicatoria</i> *	gi 188090237 gb EU498954.1	gi 188090475 gb EU499073.1

* Isolados tipo.

** Isolados patótipo.

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

- Isolados brasileiros de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* formam um grupo homogêneo com elevada variabilidade intrapatovar para um mesmo táxon;
- *X. campestris* pv. *viticola* posicionou-se no subgrupo 9.5 de *X. axonopodis*, apresentando-se estreitamente relacionada a *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* e a *X. citri* pv. *anacardii*;
- Isolados pigmentados de *X. axonopodis* apresentam-se estreitamente relacionados a *X. axonopodis* pv. *anacardii*, sendo posicionados no subgrupo 9.6 de *X. axonopodis*;
- A utilização das técnicas de rep-PCR e MLSA confirmam a proposta para reclassificação de *X. axonopodis* pv. *anacardii* e *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* como patovares de *X. citri*;
- As reclassificações de *X. campestris* pv. *viticola* como *X. citri* pv. *viticola* comb. nov. e dos isolados pigmentados de *X. axonopodis* como *X. axonopodis* pv. *anacardii* var. nov. *pigmentatus* são sugeridas.