



UFRPE

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

**Análise comparativa e funcional do genoma de
Xanthomonas citri pv. *viticola*: aplicação sobre virulência,
patogenicidade e posicionamento taxonômico**

Antonio Roberto Gomes de Farias

**Recife - PE
2020**

ANTONIO ROBERTO GOMES DE FARIAS

**ANÁLISE COMPARATIVA E FUNCIONAL DO GENOMA DE
Xanthomonas citri pv. *viticola*: APLICAÇÃO SOBRE
VIRULÊNCIA, PATOGENICIDADE E POSICIONAMENTO
TAXONÔMICO**

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:

Orientadora: Profa. Dra. Elineide Brarbossa de Souza

Coorientadores: Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama

Prof. Dr. Valdir de Quiroz Balbino

**RECIFE-PE
Agosto - 2020**

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

F224a

Farias, Antonio Roberto Gomes de

Análise comparativa e funcional do genoma de *Xanthomonas citri* pv. *viticola*: aplicação sobre virulência, patogenicidade e posicionamento taxonômico / Antonio Roberto Gomes de Farias. - 2020.
173 f. : il.

Orientadora: Elineide Barbosa de Souza.
Inclui referências e anexo(s).

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, 2020.

1. *Vitis vinifera*. 2. cancro bacteriano. 3. caracterização genômica. 4. filogenômica. 5. sistema de secreção. I. Souza, Elineide Barbosa de, orient. II. Título

CDD 632

**ANÁLISE COMPARATIVA E FUNCIONAL DO GENOMA DE *Xanthomonas citri* pv.
viticola: APLICAÇÃO SOBRE VIRULÊNCIA, PATOGENICIDADE E
POSICIONAMENTO TAXONÔMICO**

ANTONIO ROBERTO GOMES DE FARIAS

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 24/08/2020

ORIENTADORA:

Profa. Elineide Barbosa de Souza (UFRPE)

EXAMINADORES:

Dr. Nelson Bernardi Lima (INTA)

Prof. Adriano Márcio Freire Silva (UFAL)

Dr. Wilson José Silva Junior (UFPE)

Prof. Marcos Paz Saraiva Câmara (UFRPE)

RECIFE-PE
Agosto - 2020

Aos meus pais Raimundo e Maria do Carmo por todo amor, suporte, permitindo que eu chegasse até aqui e por compreender minha ausência nos últimos anos,

Ofereço.

À minha família pelo amor, amizade, suporte e incentivo em todos os momentos e a minha namorada Nan pelo amor e suporte,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Raimundo Gomes de Farias e Maria do Carmo Gomes de Farias, pelo alicerce formado e suporte, pelo incentivo para nunca desistir e focar em meus objetivos, proporcionando que eu batalhasse pelos meus sonhos e chegasse até esse momento.

Aos meus irmãos, Ronaldo, Marineide, Marileide, Ronildo, Marlene, Marilene, Rodrigo e Macilene, pelos momentos de alegrias, pela amizade, amor, apoio, carinho e risadas quando estamos juntos e por entenderem minha ausência.

À minha namorada, Nan, por todo o amor e suporte, mesmo estando tão distante.

Aos meus orientadores, Prof^a Dra. Elineide Barbosa de Souza, Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama e Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino, pela oportunidade, orientação, ensinamentos, apoio e confiança.

Ao Dr. Jong Hyun Ham da Louisiana State University - LSU, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo e pela orientação durante meu período na LSU.

À Prof^a Dra Ana Maria Benko Iseppon que através da Rede InterSys possibilitou o sequenciamento dos genomas analisados neste estudo e pelo auxílio no desenvolvimento inicial da *pipeline* de análise dos dados.

Aos colegas do LAFIBAC - UFRPE, LABBE- UFPE e Plant Bacteriology e Department of Plant Pathology and Crop Physiology - LSU, em especial ao Dr. Wilson Júnior (LABBE) e Dr. Tiago Lelis (LSU), por todo apoio, ensinamentos, suporte e aprendizado em conjunto.

À UFRPE, que como instituição me proporcionou a oportunidade de realizar o doutorado, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia e sua equipe de docentes e demais funcionários pelos ensinamentos e suporte constante.

À todas as demais instituições de ensino pelas quais passei até este momento (IFCE, UFRRJ, UFV, UFLA, UFPE e LSU) pelo ensino e suporte.

Aos amigos de fora do meio acadêmico, pela torcida e incentivos constantes.

À CAPES, pelo auxílio financeiro através da concessão da bolsa de doutorado no Brasil e Doutorado sanduíche no exterior.

A todos os demais que direta ou indiretamente contribuíram com ações que culminaram para este momento.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - Introdução Geral	11
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	12
1.1. A cultura da videira.....	12
1.2. O cancro bacteriano da videira.....	13
1.2.1. <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>viticola</i>	18
1.3. Interações <i>Xanthomonas</i> x hospedeiro.....	22
1.4. Mecanismos de patogenicidade e virulência de espécies de <i>Xanthomonas</i>	24
1.5. Uso da genômica para taxonomia	41
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
CAPÍTULO II	66
Comparative Genomics of <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>viticola</i> strains raise doubts about the classification of pathovars in <i>X. citri</i>	67
Abstract	68
Introduction.....	69
Material and methods.....	70
Results.....	72
Discussion	76
References	80
CAPÍTULO III	105
Insights into the gene content related to pathogenicity and virulence of <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>viticola</i> in grapevines.....	106
ABSTRACT.....	107

BACKGROUND	108
RESULTS	110
DISCUSSION.....	114
CONCLUSION.....	119
MATERIAL AND METHODS	120
REFERENCES.....	124
CONCLUSÕES GERAIS.....	171

RESUMO GERAL

A viticultura é uma das frutíferas de maior importância econômica mundial. O Brasil é um grande produtor, com destaque para o Submédio do Vale do São Francisco, Região Nordeste, pelo potencial produtivo econômico local. No entanto, a ocorrência de problemas fitossanitários, principalmente o cancro bacteriano da videira causado pela bactéria *Xanthomonas citri* pv. *viticola*, têm dificultado essa expansão. Detectada no Brasil pela primeira vez em 1998, esta bactéria se caracteriza como uma das mais importantes fitobacterioses da videira, pelos danos causados e pelo sério risco potencial ao desenvolvimento da viticultura no Brasil e no mundo. Em diversas espécies de *Xanthomonas* e outras bactérias fitopatogênicas, estudos genômicos e de genética molecular têm revelado os principais mecanismos de patogênese e virulência, adaptabilidade, além de inferências taxonômicas e filogenômicas desses microrganismos. No entanto, estudos envolvendo *X. citri* pv. *viticola* para estes propósitos inexistem. Este trabalho teve como objetivos realizar análises pangenômica e filogenômica de *X. citri* pv. *viticola* e espécies relacionadas e utilizar análises de genômica comparativa para obtenção de informações sobre funções de possíveis genes de patogenicidade, virulência e aplicações de técnicas moleculares para investigar as funções desses genes na interação com o hospedeiro. A análise genômica comparativa e funcional entre isolados de *X. citri* pv. *viticola* revelou diferenças na organização geral dos genomas, elementos de inserção, clusters gênicos de metabólitos secundários, e pequenas variações em relação a clusters de grupos ortólogos (COG), gene ontologia (GO) e vias metabólicas (KEGG). Além da predição de sequências de profagos provavelmente limitadas a estes genomas. Análise taxonômica *in silico* mostrou uma identidade média de nucleotídeos (ANI) e hibridização DNA-DNA (*is*DDH) maiores que 99,98% e 99,99%, respectivamente, entre isolados de *X. citri* pv. *viticola* e menores que 95,9% e 64,5%, respectivamente entre *X. citri* pv. *viticola* e outros genomas de *X. citri* usados para comparação. Além disso, análise de pangenômica, revelou que pelo menos 1.610 genes de *X. citri* pv. *viticola* são compartilhados entre outros patovares de *X. citri*. Abordagens genômicas *in silico* para a taxonomia de bactérias, através da ANI, *is*DDH e análise pangenômica, possibilitaram reforçar a recente classificação de *X. citri* pv. *viticola* como integrante da espécie e contribuiu para a discussão sobre o uso de abordagens *in silico* para a taxonomia de procariontes, mostrando que a recente classificação proposta de *X. citri* e *X. funscans* como espécie uma única espécie deve ser revisada. A análise comparativa dos fatores

de patogenicidade, virulência, seus mecanismos regulatórios e de adaptação ao hospedeiro, revelou que *X. citri* pv. *viticola* possui genes codificando enzimas degradadoras da parede celular, sistemas de secreção III e seus efetores, proteína flagelina e componentes do pilus tipo IV, os quais parecem ser os principais fatores que diferenciam a patogenicidade e virulência de *X. citri* pv. *viticola* em videiras. Além disso, mutantes deficientes para o sistema de secreção tipo III e *quorum sensing* revelaram que estes sistemas parecem ser essenciais para a patogenicidade e virulência de *X. citri* pv. *viticola* em seu hospedeiro.

Palavras-chaves: *Vitis vinifera*, cancro bacteriano, caracterização genômica, filogenômica, sistema de secreção, *quorum sensing*.

GENERAL ABSTRACT

Viticulture is one of the most worldwide economic fruit crops. Brazil stands out as a significant producer, emphasizing the Sub-Middle of the São Francisco Valley, Northeast Region, due to the local economic productive potential. However, the occurrence of phytosanitary problems, mainly the grapevine bacterial canker, caused by the bacterium *Xanthomonas citri* pv. *viticola*, have limited this expansion. Detected in Brazil for the first time in 1998, this bacterium is characterized as one of the most critical phyto-bacterioses of the vine, due to the damage caused and the potential severe risk to developing viticulture in Brazil and worldwide. In several *Xanthomonas* species and other phytopathogenic bacteria, genomic and molecular genetic studies have revealed the main mechanisms of pathogenesis, virulence, and adaptability added taxonomic and evolutionary inferences microorganisms. However, studies involving *X. citri* pv. *viticola* for these purposes does not exist. This work aimed to perform pan-genomic and phylogenomic analyzes of *X. citri* pv. *viticola* and related species and carry out comparative genomics analyses to obtain information on possible pathogenicity and virulence genes and applications of molecular techniques to investigate the functions of these genes in the host-pathogen interaction. Comparative and functional genomic analysis between strains of *X. citri* pv. *viticola* revealed differences in the general organization of genomes, insertion elements, gene clusters of secondary metabolites, and small variations concerning clusters of orthologous groups (COG), gene ontology (GO), and metabolic pathways (KEGG). In addition to the prediction of phage sequences presumably limited to these genomes. In silico taxonomic analysis showed an average nucleotide identity (ANI) and DNA-DNA hybridization (isDDH) higher than 9.98% and 99.99%, respectively, between *X. citri* pv. *viticola* strains and less than 95.9% and 64.5%, respectively, between *X. citri* pv. *viticola* and other *X. citri* genomes used for comparison. Besides, the pan-genome analysis revealed that *X. citri* pv. *viticola* shares at least 1,610 genes with other pathovars of *X. citri*. In silico genomic approaches to the taxonomy of bacteria, through ANI, isDDH, and pan-genome analysis, allowed to reinforce the recent classification of *X. citri* pv. *viticola* as a member of the species and contributed to the discussion on the use of in silico approaches to the taxonomy of prokaryotes, showing that the recently proposed classification of *X. citri* and *X. fuscans* as a single species should be reviewed. The comparative analysis of the pathogenicity, virulence factors showed that *X. citri* pv. *viticola* has genes encoding cell wall degrading enzymes, secretion systems III and

their effectors, flagellin protein, and components of pilus type IV, which seem to be the main factors that differentiate its pathogenicity and virulence in vines. Also, mutants deficient for the type III secretion system and *quorum sensing* revealed that these systems appear to be essential for the pathogenicity and virulence of *X. citri* pv. *viticola* in its host.

Keywords: *Vitis vinifera*, bacterial canker, genome characterization, phylogenomic, secretion system, quorum sensing.

CAPÍTULO I



Introdução Geral

ANÁLISE COMPARATIVA E FUNCIONAL DO GENOMA DE *Xanthomonas citri* pv. *viticola*: APLICAÇÃO SOBRE VIRULÊNCIA, PATOGENICIDADE E POSICIONAMENTO TAXONÔMICO

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. A cultura da videira

A videira (*Vitis vinifera* L.) é uma frutífera cultivada em uma vasta extensão das regiões tropicais, subtropicais e temperadas. Comercialmente é utilizada para diferentes finalidades, as quais incluem, uvas de mesa (consumo *in natura*), vinificação, uvas secas (passas) e sucos doces (LEÃO, 2004). Em 2018 foram cultivados cerca de 7,2 milhões de ha, produzindo 79,2 milhões de frutos. Entre os principais países produtores destacam-se China Continental, Itália, Estados Unidos, Espanha, França e Turquia (FAO, 2020). Segundo o mesmo órgão, o Brasil ocupa a décima quarta posição no *ranking*, com produção no ano de 2018 de 1,6 milhões de toneladas.

A produção brasileira de uva destaca-se principalmente das regiões Sul, com produção voltada para a vinicultura, enquanto nas regiões Sudeste e Nordeste a produção é destinada principalmente para o consumo *in natura* (LEÃO, 2004). Na região Nordeste, a produção é concentrada nos estados de Pernambuco e Bahia, mais especificamente no Submédio do Vale do São Francisco, no Polo Petrolina-Juazeiro, com o uso de irrigação, onde a produção voltada para a vinicultura também se encontra em expansão (VITAL, 2009).

Até fevereiro de 2020 a produção nacional de uvas foi estimada em 1,5 milhões de toneladas, produzidos em uma área de 73.747 ha, alcançando rendimento médio de 21.022 kg.ha⁻¹ (IBGE, 2020). O estado do Rio Grande do Sul contribuiu com 54,3% da produção de uvas no país, seguido pelos estados de Pernambuco, São Paulo, Bahia, Paraná e Santa Catarina. Na Região Nordeste, os estados de Pernambuco e Bahia, contribuíram com 99,2% da produção regional e 27,3% da produção nacional (IBGE, 2020), com grande parte dessa produção destinada ao mercado externo (LEÃO *et al.*, 2011), representando cerca de 99% das exportações da fruta (LAZZAROTTO; FIORAVANÇO, 2013).

Dadas as condições climáticas do Submédio do Vale do São Francisco, associadas ao uso de irrigação, essa região é considerada uma das melhores regiões do mundo para o plantio de uvas de mesa (PEREIRA *et al.*, 2011). A produção ocorre o ano todo, com a obtenção de até 2,5

colheitas.ano⁻¹ (PEDRO JÚNIOR; SENTELHAS, 2003; ZANINI; ROCHA, 2010) e produtividades superiores a 30 t.ha⁻¹.ano⁻¹, ultrapassando aquelas alcançadas nas demais regiões produtoras do país (SILVA; COELHO, 2010), obtendo melhores oportunidades de preços pelas janelas de mercado (ALBURQUERQUE, 1996; LEÃO, 2004). Além disso, o cultivo da videira na região destaca-se pelo seu papel socioeconômico com a geração de milhares de empregos diretos e indiretos (ARAUJO, 2001).

Apesar de sua relevância econômica e social, o desempenho da viticultura no Semiárido brasileiro é limitado pela constante ocorrência de problemas fitossanitários causados principalmente por fungos, vírus e bactérias, os quais têm onerado os produtores devido aos custos de manejo e a baixa produtividade das plantas quando atacadas. Esse problema é ainda mais grave quando se trata da bactéria *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Nayudu) Dye comb. nov. Gama *et al.*, agente causal do cancro bacteriano, que tem comprometido a produção nas áreas em que ocorre, devido a ausência de variedades resistentes e de medidas curativas.

1.2. O cancro bacteriano da videira

O cancro bacteriano da videira foi relatado pela primeira vez em 1969 na Índia, ocasionando sintomas de cancro na variedade Anab-e-Shahi (NAYUDU, 1972). No Brasil, a doença foi detectada pela primeira vez em 1998, em parreirais da cultivar Red Globe, na cidade de Petrolina, estado de Pernambuco (LIMA *et al.*, 1999; MALAVOLTA JR *et al.*, 1999), possivelmente introduzida a partir da importação de bacelos contaminados oriundos da Índia (FREIRE; OLIVEIRA, 2001; RODRIGUES NETO *et al.*, 2011). Após a primeira detecção, a doença rapidamente constatada em outras áreas produtoras, sendo detectada no mesmo ano nos estados da Bahia e Piauí (LIMA *et al.*, 1999; MALAVOLTA JR *et al.*, 1999) e mais tarde nos estados do Ceará (FREIRE; OLIVEIRA, 2001), Goiás (JUNQUEIRA *et al.*, 2006), Minas Gerais (JUNQUEIRA *et al.*, 2006; MARQUES, 2007), Roraima (HALFELD-VIEIRA; NECHET, 2006), Paraná (TOMAZ *et al.*, 2011) e São Paulo (RODRIGUES NETO *et al.*, 2011). Apesar dos relatos da doença em diversos estados, medidas de erradicação foram adotadas na maioria deles e atualmente é considerada uma praga quarentenária presente apenas nos estados da Bahia, Ceará, Pernambuco e Roraima (BRASIL, 2018).

Após sua ocorrência no Brasil, esta doença caracterizou-se como uma das mais importantes enfermidades bacterianas da videira, responsável por danos severos e representando sério potencial

de risco ao desenvolvimento da viticultura brasileira (ARAÚJO *et al.*, 2005), podendo tornar-se um grande problema em áreas produtoras de uva da América, Austrália e Europa (MIDHA; PATIL, 2014). Além do Brasil, o cancro bacteriano da videira está limitado a Índia (JAMBENAL; HIREMANI; HIREMANI, 2011), Tailândia (BUENSANTEAI, 2004), África (MIDHA; PATIL, 2014) e Ucrânia (KOCHENKO, 1993).

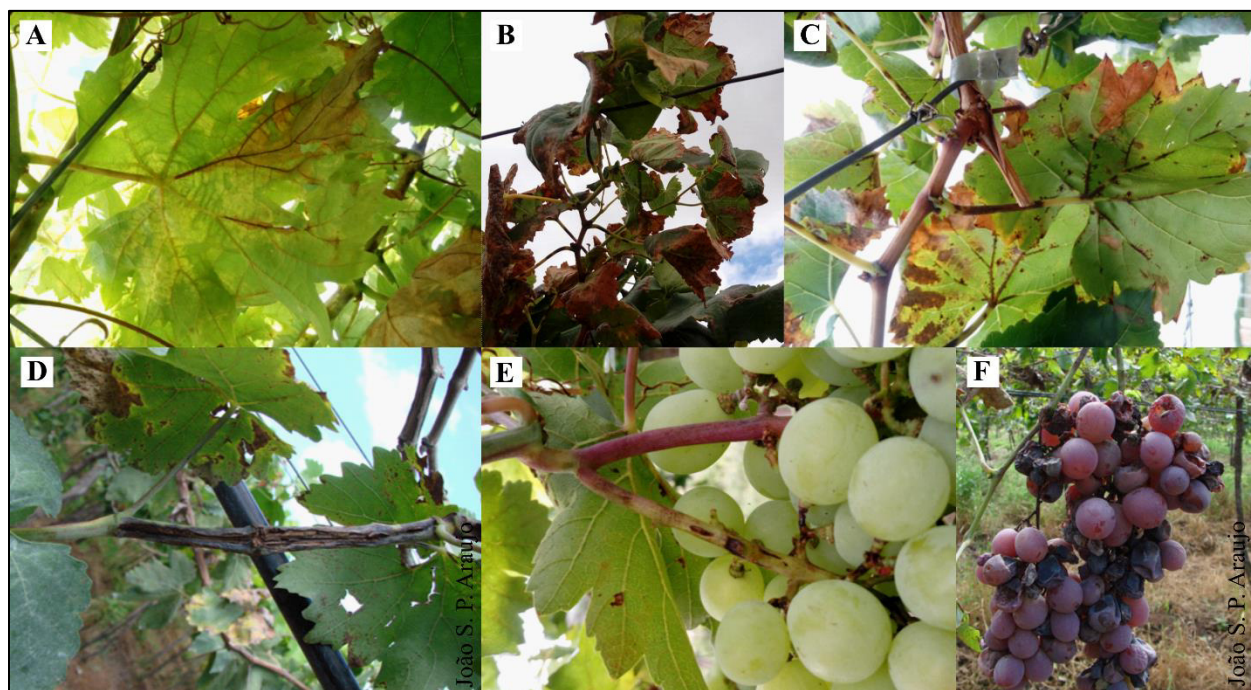
A incidência da bacteriose é variável, e no Brasil pode chegar até 100% dependendo do cultivar e da época do ano (LOPES; NASCIMENTO, 2004). Em levantamentos realizados por esses autores em 2004, de 18 propriedades visitadas, 94,4% apresentaram plantas com sintomas da doença, com a incidência variando de 10 a 100% em parcelas da cultivar Sugraone e 92 a 100% em Red Globe. Na Índia, foram registradas perdas de 60% a 80% da produção em parreirais infectados (CHAND; KISHUN, 1990). Na Tailândia, embora amplamente distribuída nos campos de produção (BUENSANTEAI, 2004), não existem dados epidemiológicos da doença, bem como para as ocorrências na África e Ucrânia.

Além da videira, *X. citri* pv. *viticola* também foi detectada infectando naturalmente plantas de neem (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae) e *Phyllanthus maderaspatensis* L. (Euphorbiaceae) na Índia (NAYUDU, 1972). No Brasil, em levantamento do cancro bacteriano da videira em parreirais do Submédio do Vale do São Francisco também se observou infecção natural de *X. citri* pv. *viticola* em plantas invasoras presentes no parreiral como periquito ou alecrim (*Alternanthera tenella* Colla), caruru ou bredo (*Amaranthus* sp.), soja perene (*Glycine* sp.), fedegoso (*Senna obtusifolia* (L.) Irwin & Barneby (PEIXOTO *et al.*, 2007), melão-são-caetano (*Momordica charantia* L.) e quebra-pedra *Phyllanthus* sp. (PEIXOTO *et al.*, 2006). Inoculação artificial da bactéria foi capaz de causar sintomas em plantas de mangueira (*Mangifera indica* L.), cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda), cajá-manga (*Spondias dulcis* Forst.), aroeira (*Schinus terebenthifolius* Radii) (ARAÚJO, 2001), neem (MALAVOLTA; ALMEIDA, 2000), alecrim (*Alternanthera tenella* Colla), bredo (*Amaranthus* sp.), soja perene (*Glycine* sp. L.), fedegoso (*Senna obtusifolia* (L.) Irwin e Barneby), brilhantina (*Pilea* sp.), 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).

Os sintomas da doença podem ser observados em folhas, ramos, flores e frutos (Figura 1). Nas folhas surgem como pequenas lesões necróticas e angulares, com presença ou não de halos

cloróticos, distribuídas no limbo foliar (LIMA; MOREIRA, 2002). Ao coalescerem causam crestamento e necrose de extensas áreas do limbo foliar (NAYUDU, 1972). Em alguns casos também pode ocorrer formação de manchas setoriais, pardacentas e em estádios mais avançados de infecção, as folhas tornam-se amarelas e caem (FREIRE; OLIVEIRA, 2001). Nas nervuras os sintomas surgem como estrias e/ou manchas escuras irregulares, deprimidas e alongadas na face abaxial do limbo foliar, as quais podem evoluir para fissuras longitudinais de coloração escura, denominadas cancos (FREIRE; OLIVEIRA, 2001; MALAVOLTA JÚNIOR *et al.*, 1999; NAYUDU, 1972). Sintomas de cancro também são observados em pecíolos, ramos e ráquis dos frutos (FREIRE; OLIVEIRA, 2001; MALAVOLTA JÚNIOR *et al.*, 1999; NAYUDU, 1972). Com a evolução da infecção, gradualmente, os cancos alargam-se expondo os tecidos internos. A infecção pode tornar-se sistêmica, ao alcançar o sistema vascular da planta. Em corte longitudinal de ramos infectados, pode-se observar a presença de descoloração vascular (LIMA; MOREIRA, 2002).

Figura 1: Sintomas do cancro bacteriano da videira causados por *Xanthomonas citri* pv. *viticola*. (A) Lesões encharcadas iniciais no limbo foliar e nervuras; (B) Crestamento e necrose áreas extensas do limbo foliar; (C) Manchas escurecidas nas nervuras, pecíolo foliar e manchas necróticas, com halo clorótico em folhas; (D) Cancros em ramos; E) Cancros no engão com necrose nos pedicelos; F) Cacho apresentando bagas murchas (Fonte: D e F: João S. P. Araújo).



Em infecções severas os sintomas aparecem nas inflorescências e cachos. Na inflorescência

os sintomas necróticos podem surgir a partir da extremidade em direção a base. Na ráquis ou engajo dos cachos verificam-se sintomas similares aos observados em ramos, com a presença de manchas escuras e a formação de cancrios. Em bagas, podem ocorrer lesões escuras e levemente arredondadas. Em cachos já formados, há murcha de bagas após necrose da ráquis e dos pedicelos. O ataque da doença é mais intenso nos frutos quando a infecção ocorre no início da frutificação, e os sintomas são constatados na extremidade dos cachos ou no ponto de inserção do pedúnculo no ramo (LIMA; MOREIRA, 2002). Nos cachos, os sintomas aparecem na forma de lesões necróticas arredondadas, de tamanho e cor variável, podendo ocasionar murcha das bagas quando ocorre grandes cancrios na ráquis (LIMA *et al.*, 1999; MALAVOLTA JÚNIOR *et al.*, 1999, NAYUDU, 1972; NASCIMENTO; MARIANO, 2004), comprometendo a comercialização dos frutos. A intensidade dos sintomas é variável, dependendo do nível de tolerância da variedade (LIMA, 2000). Os sintomas também variam dependendo das condições ambientais, onde são mais severos no primeiro semestre do ano, devido a temperatura elevada e alta umidade relativa, favoráveis ao desenvolvimento da doença (ARAUJO; ROBBS; MACIEL, 1999).

Em condições favoráveis, a bactéria sobrevive de um ciclo para outro de forma epifítica no filoplanto ou em plantas infectadas, aderidas as nervuras e aos tricomas (ARAUJO; ROBBS, 2000). Estudos de microscopia eletrônica de varredura mostraram células bacterianas aderidas à superfície da planta por meio de fixação não polar em monocamada, principalmente na superfície de vasos e tricomas no limbo foliar (ARAUJO *et al.*, 2004). Além disso, *X. citri* pv. *viticola* também sobrevive em restos culturais infectados por pelo menos 80 dias (SILVA *et al.*, 2012) e em hospedeiros alternativos (PEIXOTO *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2014). Sua disseminação a longas distâncias e introdução em parreirais sadios ocorre por meio de mudas provenientes de bacelos infectados (NASCIMENTO, 2004) ou bagas infectadas (TOSTES *et al.*, 2014), os quais podem ser oriundos de plantas infectas ou podem ser contaminados durante etapas do processo de obtenção das mudas (FERREIRA-TONIN, 2012). Tostes *et al.* (2014) visualizaram em amostras de sementes, sintomáticas e assintomáticas, agregados bacterianos na superfície do invólucro e na primeira camada do parênquima abaixo do tegumento da semente, atestando a capacidade de disseminação da bactéria em frutos contaminados. Nos parreirais, a disseminação pode ocorrer através de restos culturais infectados espalhados pelo pomar, aderidos em roupas, veículos e instrumentos agrícolas utilizados na colheita (luvas, tesouras de poda e contentores) e nos tratos culturais (poda, desbrota e raleio de bagas) (NASCIMENTO; MARIANO, 2004). Cancrios

formados em plantas doentes, também se caracterizam como importantes fontes de inóculo para disseminação da bactéria por meio de respingos de água da chuva associados a ocorrência de ventos (CHAND; PATIL; KISHUM, 1991; NAYUDU, 1972).

A penetração de *X. citri* pv. *viticola* no hospedeiro pode ocorrer no mesófilo por meio de aberturas naturais, como os estômatos, e através de danos causadas por tratos culturais, ventos fortes (NASCIMENTO; MARIANO, 2004) e danos nos tricomas (ARAUJO; ROBBS, 2000). Após penetração, a bactéria multiplica-se rapidamente, colonizando os espaços intercelulares, podendo atingir o sistema vascular, resultando em infecções sistêmicas (ARAUJO; ROBBS, 2000).

A reação de variedades de videira e espécies de *Vitis* à *X. citri* pv. *viticola* é variável. Na Índia, Chand (1992) realizou estudo com 14 espécies de *Vitis*, espécies de sete gêneros da família Vitaceae (*Ampelocissus* sp., *Ampelapsis* sp., *Cayratia* sp., *Cissus* sp., *Parthenocissus* sp., *Tetrastigma* sp. e *Leea* sp.) e 73 cultivares de *V. vinifera* L., em condições de infecção natural e artificial. Nesse estudo *V. vinifera* se mostrou altamente susceptível, enquanto as sete espécies de outros gêneros, e algumas espécies de *Vitis* (*V. longii* Prince, *V. riparia* Michaux, *V. palmata* Vahl, *V. parviflora* Roxburgh) foram altamente resistentes. Além disso, entre as cultivares de *V. vinifera*, as sem sementes foram mais suscetíveis que as com sementes, com as pigmentadas mais suscetíveis em relação às brancas.

No Brasil, Malavolta Júnior *et al.* (2003) avaliaram a reação de variedades de videira das espécies *V. vinifera* e de híbridos de *V. labrusca* L. com *V. vinifera*, por meio de inoculações artificiais de *X. citri* pv. *viticola* e mostraram que as variedades avaliadas diferiram quanto ao grau de resistência à bactéria. Os híbridos de *V. labrusca* x *V. vinifera* (Niagara Branca e Niagara Rosada) apresentaram baixos índices de severidade de doença e as variedades de *V. vinifera* (Red Globe, Benitaka, Rubi e Itália) mostraram os maiores índices de severidade. Resultados semelhantes foram observados por Nascimento *et al.* (2006) ao verificarem que o clone Paulsen 1103 (*V. berlandieri* Planchon x *V. rupestris* Scheele x *V. riparia* Michaux) apresentou menor severidade da doença, enquanto que nos clones Brasil (*V. vinifera*) e Isabel (*V. labrusca*) a intensidade da doença foi maior.

Germoplasmas de *V. vinifera*, *V. labrusca* e outros híbridos de *Vitis* (n=38) foram analisados quanto a resistência à *X. citri* pv. *viticola* em casa de vegetação (KAMBLE *et al.*, 2017). A maioria das variedades pertencentes a *V. vinifera*, especialmente as brancas sem sementes, como

a Thompson Seedless foram altamente suscetíveis. Da espécie *V. labrusca* apenas a variedade roxa Bangalore apresentou o mesmo fenótipo. Contrariamente, outros germoplasmas de *V. labrusca* e os híbridos apresentaram baixo grau de suscetibilidade ou resistência a *X. citri* pv. *viticola*. A resistência dos híbridos de *V. labrusca* x *V. vinifera* indicam que essa característica é oriunda de *V. labrusca*, a qual carrega os genes responsáveis por este fenótipo (NASCIMENTO *et al.*, 2006). Entretanto, Malavolta Júnior *et al.* (2003) alertaram para a importância de cuidados com o trânsito de material vegetal e introdução de mudas em estados brasileiros livres do patógeno, uma vez que a bactéria também pode infectar os híbridos de *V. labrusca* x *V. vinifera*.

Para o controle do cancro bacteriano na videira são recomendadas medidas preventivas, uma vez que não existem produtos registrados específicos para esta doença. Aplicações de compostos cúpricos e calda bordalesa são realizadas após a poda e brotação ou quando há ferimentos nas plantas. No entanto, já foram detectados isolados da bactéria com resistência ao cobre (MARQUES; UESUGI; FERREIRA, 2009; KAMBLE *et al.*, 2017). Estudo buscando meios de desinfestação de equipamentos de colheita de uvas verificou que hipoclorito de sódio (5000 ppm) e cloreto de docecil dimetil amônio (570 ppm) foram eficazes na eliminação de *X. citri* pv. *viticola* (NAUE *et al.*, 2014a). Entretanto, termoterapia de bacelos e a utilização de bactericidas e sanitizantes não foram eficazes para erradicar a bactéria de bacelos infectados (NAUE *et al.*, 2014b). A indexação *in vitro* de material propagativo foi indicada como uma alternativa eficiente para produção de mudas livres do patógeno (SILVA *et al.*, 2013).

Devido ao fato de *X. citri* pv. *viticola* ser para o Brasil uma praga quarentenária presente, o manejo do cancro bacteriano é estabelecido pela Instrução Normativa (IN) Nº 2, de 6 de fevereiro de 2014 (BRASIL, 2014). Essa IN determina quais medidas fitossanitárias devem ser adotadas pelo produtor, importador, comerciante ou detentor de plantas e partes de plantas de espécies do gênero *Vitis*, para prevenção, controle e erradicação da praga *X. citri* pv. *viticola*, bem como pelo produtor, proprietário, arrendatário ou ocupante a qualquer título, de propriedade e pelos órgãos oficiais de defesa agropecuária.

1.2.1. *Xanthomonas citri* pv. *viticola*

Xanthomonas (do grego: *xanthos* (amarelo) e *monas* (entidade)) compreende um gênero de bactérias Gram-negativas associadas exclusivamente a plantas. As bactérias desse gênero

apresentam formato de bastonete com um único flagelo polar, são aeróbios obrigatórios com temperatura ótima de crescimento entre 25 e 30 °C (BRADBURY, 1984) e estabelecem relações epifíticas e patogênicas, não colonizando outros nichos de forma duradoura (DARRASSE *et al.*, 2013). O gênero compreende 36 espécies (PARTE, 2018), causando doenças graves em cerca de 400 plantas (124 monocotiledôneas e 268 dicotiledôneas), incluindo uma grande variedade de culturas agronomicamente importantes, como mandioca, arroz, citros, banana, couve, tomate, pimenta e feijão (HAYWARD, 1993; MANSFIELD *et al.*, 2012; RYAN *et al.*, 2011; VAUTERIN *et al.*, 2000), induzindo os mais diversos sintomas a depender da espécie bacteriana e da planta hospedeira (RYAN *et al.*, 2011).

Xanthomonas citri pv. *viticola* foi classificada pela primeira vez como *Pseudomonas viticola* Nayudu sp. nov. (NAYUDU, 1972). Após a alteração do sistema de classificação de bactérias fitopatogênicas, com a introdução do termo patovar por Young *et al.* (1978), para classificação infrasubspecífica, mais de 100 fitobactérias da espécie *X. campestris* (Pammel) Dowson foram reclassificadas a nível de patovar, com base em características fenotípicas e especificidade de hospedeiros. Nessa ocasião, *P. viticola* foi reclassificada como *X. campestris* pv. *viticola* Young *et al.* (YOUNG; DYE E BRADBURY, 1978). Entretanto, em 1995 Vauterin *et al.* (1995) sugeriram a reclassificação do gênero *Xanthomonas*, onde diversos epítetos de *X. campestris* deveriam ser reclassificados como novas espécies e /ou patovares de novas espécies.

Diversos estudos mostraram a divergência de *X. citri* pv. *viticola* da espécie *X. campestris*. Takita *et al.* (2004) usando a região *rpf* (Regulação de Fatores de Patogenicidade) de isolados de diversos patovares de *X. campestris* sugeriram que *X. campestris* pv. *viticola* fosse classificada como *X. citri* (ex Hasse) Gabriel *et al.*, por apresentar maior similaridade com esta espécie. Análise filogenética utilizando o gene *housekeeping gyrB* também agrupou *X. campestris* pv. *viticola* com espécies de *X. citri* (PARKINSON *et al.*, 2009). Mas recentemente, utilizando sequências de genoma completo, Midha e Patil (2014) realizaram filogenia de 31 genes *hoesekeeping* e análise de identidade média de nucleotídeos, verificando que *X. campestris* pv. *viticola* é um patovar de *X. citri*, com mais de 98,8% de identidade de nucleotídeos. O mesmo resultado foi verificado por Bansal *et al.* (2017). Porém, apenas no ano seguinte foi proposta a reclassificação de *X. campestris* pv. *viticola* como *X. citri* pv. *viticola* (Nayudu) Dye comb. nov. (GAMA *et al.*, 2018), baseada em uma abordagem polifásica incluindo testes fisiológicos, bioquímicos, patogenicidade, análise de sequência multilocus (MLSA), análises de identidade nucleotídica e coeficientes de correlação de

frequência tetranucleotídica de genomas completos. Desde então passou-se a utilizar esse epíteto em publicações científicas, apesar de ainda não ter o reconhecimento do Comitê Internacional de Taxonomia de Fitobactérias da Sociedade Internacional de Fitopatologia.

Morfologicamente, *X. citri* pv. *viticola* é um bastonete, Gram-negativo, com dimensões de 0,6 x 1,2 - 2,5 µm, apresentando um flagelo polar (ARAUJO; ROBBS, 2000; NAYUDU, 1972). As colônias formadas em meio ágar nutritivo são arredondadas, convexas, brilhantes, com borda lisa e coloração esbranquiçada, diferindo da maioria das espécies de *Xanthomonas* por não produzir o pigmento xantomonadina, que confere a coloração amarela as colônias. Quanto às características bioquímicas e fisiológicas, *X. citri* pv. *viticola* não utiliza o nitrato como fonte de nitrogênio e a asparagina não é utilizada como fonte de carbono e nitrogênio. Apresenta bom crescimento em sais de amônio e ácido glutâmico, embora cresça melhor em caseína hidrolisada (NAYUDU, 1972). Produz ácidos a partir de D(-) arabinose, D-frutose, D(+) galactose, D-glicose, D(-) manitol, manose, melibiose, sacarose e 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). Em meio de cultura líquido, *X. citri* pv. *viticola* apresenta tolerância a NaCl até 2 % (LIMA *et al.*, 1999), embora Nascimento *et al.* (2005a) verificaram que a bactéria pode crescer em até 3 %, chegando a zero na concentração de 6% (NASCIMENTO; MARIANO; GAMA, 2005). Apresenta reação de hipersensibilidade negativa em folhas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) cv. White Burley (LIMA *et al.*, 1999) e positiva em folhas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) da cultivar Santa Clara (MALAVOLTA JÚNIOR *et al.*, 1999).

A detecção de *X. citri* pv. *viticola* pode ser realizada com a utilização de testes sorológicos com os anticorpos policlonais AC 4558 e AC 4560 (ARAUJO *et al.*, 2005) e moleculares através da reação de PCR com os primers Xcv1F/Xcv3R e RST2/Xcv3R, os quais amplificam uma região do gene *hrpB* (TRINDADE *et al.*, 2007). Apesar destes serem considerados semiespecíficos e por real-time PCR e BIO-PCR (VILLELA *et al.*, 2019). Em complementação e esses métodos, para distinguir isolados de *X. citri* pv. *viticola* de outras patovares de *X. citri* são recomendadas análises de rep-PCR, MLSA, identidade média de nucleotídeos e correlação de tetranucleotídeos (GAMA *et al.*, 2018).

Isolados de *X. citri* pv. *viticola* apresentam grande variabilidade genética. Análises moleculares por meio de rep-PCR mostraram a existência de variabilidade genética entre isolados de *X. campestris* pv. *viticola* coletados nos estados da Bahia, Pernambuco, Piauí e Minas Gerais

(MARQUES *et al.*, 2007; TRINDADE; LIMA; FERREIRA, 2005). Analisando isolados coletados ao longo dos anos 1998 a 2001, nos estados de Pernambuco, Bahia e Piauí verificou-se a formação de cinco subgrupos ao nível de 68% de similaridade entre 40 isolados analisados (TRINDADE; LIMA; FERREIRA, 2005). Adicionalmente, dentre 32 isolados coletados de 1998 a 2006, ao nível de 70% de similaridade também foram detectados cinco subgrupos nos estados da Bahia, Pernambuco e Minas Gerais (MARQUES, 2007).

Ferreira *et al.* (2019) realizaram MLSA baseada em sete genes *housekeeping* e multilocus das repetições em tandem de número variável (MLVA) de oito *loci*, para avaliar a relação genética entre isolados da Índia e do Brasil, oriundos de diferentes hospedeiros. A MLSA não mostrou diversidade nos sete genes, agrupando isolados de videira e amaranto (*Amaranthus* sp.) em um grupo monofilético em *X. citri*. Entretanto, análise de tipagem número variável de repetições em tandem (do inglês: variable number of tandem repeats - VNTR) realizada com 107 isolados detectou 101 haplótipos, com 5 a 12 *loci*. Os autores também mostraram que isolados brasileiros foram visivelmente separados dos isolados indianos e que isolados de *Amaranthus* sp. apresentaram alelos únicos em dois *loci*. Além disso, foi comprovado que isolados coletados em 1998 pertencem a dois grupos distintos, sugerindo duas introduções de materiais de plantio contaminados com isolados geneticamente distintos. Esse trabalho mostrou a correlação entre a origem e o hospedeiro dos isolados analisados.

Com o sequenciamento do genoma de isolados de *X. citri* pv. *viticola* novas abordagens têm sido feitas para o entendimento desta fitobactéria. A primeira abordagem genômica desta fitobactéria foi realizada por Midha e Patil (2014), realizando o sequenciamento e análises do genoma do isolado patótipo LMG 965. As análises revelaram que, de modo geral, *X. citri* pv. *viticola* possui características estruturais semelhantes àquelas da maioria das *Xanthomonas* já sequenciadas. Análises filogenômicas utilizando um conjunto de 31 genes *housekeeping* mostraram que *X. campestris* pv. *viticola* forma grupo distinto de *X. citri* pv. *citri* (Hasse) Constantin *et al.*, *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* Constantin *et al.* (sin. *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* (Patel *et al.*) Ah-You *et al.*) e *X. citri* pv. *punicae* (Hingorani & Singh,) Constantin *et al.* (sin. *X. axonopodis* pv. *punicae* (Hingorani & Singh) Vauterin *et al.*, mas possui um ancestral comum. Utilizando a Identidade Média de Nucleotídeos (ANI) para estudar essa relação filogenética encontraram valores superiores a 98,8%, sugerindo que esses patovares pertencem a mesma espécie, tratando-se de isolados especializados. Análises também mostraram

que essas espécies formam um grupo de linhagens clonais, constituído de diferentes sublinhagens e que *X. citri* pv. *viticola* possui a maioria das regiões genômicas conservadas únicas, quando comparadas com as outras *Xanthomonas*, com diferenças no conteúdo de GC e variações únicas no loci *hrp* para cada um dos patovares. Analisando o *cluster* de genes que codifica para o pigmento xanthomondina os autores mostraram que *X. citri* pv. *viticola*, possui *cluster* similar aos demais patovares apigmentados. Embora este *cluster* tenha sido semelhante, em *X. citri* pv. *viticola* foi encontrada uma mutação devido à deleção de quatro nucleotídeos na posição 352, no gene que codifica uma fosfatase/dehidratase, necessária para a produção de pigmento, resultando na formação de uma proteína incompleta. Tais informações caracterizam um ponto de partida para o entendimento da funcionalidade do genoma dessa bactéria. Apenas dois genomas de isolados brasileiros encontram-se disponíveis no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/?term=Xanthomonas>) sem uma caracterização detalhada (FERREIRA *et al.*, 2019; LIMA *et al.*, 2018). Como dados genômicos e análises comparativas e espécies de *Xanthomonas* são amplamente relatados na literatura, estas informações podem ser contrastadas com genomas de *X. citri* pv. *viticola* para entender os mecanismos de patogênese e virulência de *X. citri* pv. *viticola*, bem como para estabelecer relações dessa bactéria com outras espécies de *Xanthomonas* através de análises de pangenômica e filogenômica.

1.3. Interações *Xanthomonas* x hospedeiro

Apesar da ampla gama de plantas que pode ser infectada por *Xanthomonas* spp., a gama de hospedeiros de cada espécie individual é tipicamente restrita a uma única planta ou a algumas plantas, geralmente da mesma família botânica (JACQUES *et al.*, 2016). Devido a um alto grau de especificidade de hospedeiro e tecidos, espécies de *Xanthomonas* foram definidas como patovar, um grupo infra-subespecífico de isolados que causam a mesma doença na mesma faixa de hospedeiros (DYE *et al.*, 1980), determinados por características do hospedeiro e/ou especificidade do tecido, podendo colonizar vasos do xilema ou os espaços intercelulares do parênquima do mesófilo do hospedeiro (JACQUES *et al.*, 2016; RYAN *et al.*, 2011).

Além da especificidade de hospedeiro, grupos de isolados de *Xanthomonas* sp. apresentam variações interespecíficas de hospedeiros denominadas raças. Raças foram descritas em *X. campestris*

pv. *campestris*, *X. citri* pv. *glycines* (Nakano) Constantin *et al.*, *X. citri* pv. *malvacearum* (Smith) Schaad *et al.* Constantin *et al.*, *X. euvesicatoria* pv. *vesicatoria* (Jones *et al.*) Constantin *et al.* (sin. *X. campestris* pv. *vesicatoria* Jones *et al.*, *X. perforans* Jones *et al.* e *X. gardneri* (ex Šutič) Jones *et al.*) e *X. oryzae* pv. *oryzae* (Ishiyama) Swings *et al.* (ATHINUWAT *et al.*, 2009; DELANNOY *et al.*, 2005; KAMOUN *et al.*, 1992; KUROWSKI; CONN; HIMMEL, 2019; VICENTE; HOLUB, 2013; ZHANG *et al.*, 2013). Os grupos de isolados destes patovares interagem especificamente com cultivares que compreende, na sua maioria, linhagens isogênicas, carregando genes específicos para resistência, ou variantes intraespecíficas do hospedeiro, variedades com resistência específica (JACQUES *et al.*, 2016; VICENTE; HOLUB 2013).

Os fundamentos genéticos e moleculares para a determinação da gama de hospedeiros em *Xanthomonas* ainda são em sua maioria desconhecidos (JACQUES *et al.*, 2016). Estudos genômicos comparativos e funcionais estão esclarecendo como bactérias integrantes deste gênero se adaptaram para explorar uma enorme diversidade de hospedeiros e tecidos de plantas (RYAN *et al.*, 2011). A determinação de novos determinantes moleculares da especificidade do hospedeiro e as características gênicas e não gênicas específicas de patovares relacionadas à adaptação ao hospedeiro podem ser obtidas com a análise do genoma completo (JACQUES *et al.*, 2016). Segundo esses autores essas assinaturas compreendem: polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) resultantes de evolução convergente (ou divergente), ilhas gênicas ou recombinação resultante de transferência horizontal de genes e/ou seleção positiva resultante da pressão de seleção conduzida pelo hospedeiro. Análises da distribuição desses genes em isolados que representam a diversidade genética de bactérias fitopatogênicas e a comparação de sequências de alelos devem revelar a sua história evolutiva e permitir a seleção de candidatos para outras análises funcionais (DARRASSE *et al.*, 2013).

No entanto, os fatores mais prováveis envolvem fatores bacterianos que melhoram a adaptação fisiológica ao ambiente da planta como tropismo, fixação, nutrição, degradação de compostos vegetais ou limitar a obtenção de imunidade vegetal (BÜTTNER; BONAS, 2010). A infecção bem-sucedida de plantas hospedeiras geralmente depende de sistemas de secreção bacteriana de proteínas que, secretam proteínas no meio extracelular ou transportam proteínas e/ou DNA diretamente para o citosol da célula hospedeira, um processo denominado translocação (AN, *et al.*, 2019; BÜTTNER; BONAS, 2010). As proteínas que são translocadas para a célula hospedeira são designadas proteínas efetoras.

A restrição da gama de hospedeiros para a maioria das bactérias ocorre principalmente devido a ação de proteínas efetores do tipo III (T3E) que desencadeiam a imunidade pelo Padrão molecular associado ao patógeno (PAMPs) ou imunidade desencadeada por PAMPs (PTI), a primeira camada da imunidade inata da planta (BOULANGER; NOËL, 2016; JONES; DANGL, 2006). Dessa forma a chave para a patogenicidade e expansão da gama de hospedeiros é a capacidade do patógeno em suprimir a PTI. Esta é a principal função da maioria dos T3E descritos ou genes *avr* bacterianos (WHITE *et al.*, 2009). T3E são injetadas diretamente dentro das células vegetais, usando uma seringa molecular conhecida como sistema de secreção do tipo III. Como contramedida, essas proteínas interagem com as proteínas correspondentes de resistência às plantas, levando à morte localizada das células vegetais, limitando a disseminação e a multiplicação do patógeno, característica de uma resposta hipersensível (JACQUES *et al.*, 2016). Essa resposta é a resposta imune conhecida como imunidade desencadeada por efector (ETI) em um conjunto de espécies de plantas, resultando em uma reduzida gama de hospedeiros. Quando a ETI é suprimida, a planta se torna susceptível e a bactéria patogênica.

1.4. Mecanismos de patogenicidade e virulência de espécies de *Xanthomonas*

Vários fatores associados com a patogenicidade e a virulência de isolados de *Xanthomonas* têm sido identificados. O sequenciamento do genoma completo de várias espécies e patovares de desse gênero facilitou análises funcionais com o propósito de entender as bases moleculares da virulência e adaptação (AN *et al.*, 2019). Esses fatores são empregados pelas bactérias para entrada no tecido do hospedeiro e obtenção de nutrientes, ao mesmo tempo superar os mecanismos de defesa das plantas. Incluem estruturas da superfície das células bacterianas, diferentes sistemas de secreção de proteínas e suas respectivas proteínas secretadas e vias reguladoras subjacentes ao controle da expressão gênica da virulência (BÜTTNER; BONAS, 2009). Diversos patógenos utilizam um ou a combinação de diferentes fatores para se multiplicarem eficientemente nos tecidos do hospedeiro e causarem a doença (PRESTON *et al.*, 2005).

Os avanços nos estudos dos genes envolvidos na patogenicidade e virulência de *Xanthomonas* sp. se iniciaram com o sequenciamento e anotação do genoma de *X. citri* pv. *citri* por Da Silva *et al.* (2002), com o início de abordagens de genômica funcional. O desenvolvimento de novas tecnologias de sequenciamento genômico e o sequenciamento do genoma de diversas

espécies bacterianas permitiu identificar uma série de genes relacionados com a virulência e patogenicidade de espécies de *Xanthomonas*. O sequenciamento genômico é uma técnica que permite identificar, na ordem correta, a sequência de nucleotídeos de uma molécula de ácido nucleico, visando julgar a informação genética contida em sua estrutura (FIETTO; MACIEL, 2015). O primeiro genoma bacteriano sequenciado foi o de *Haemophilis influenza* (Fleischmann *et al.* 1995). Na área da fitopatologia, a genômica iniciou com a publicação do sequenciamento do genoma da bactéria *X. fastidiosa* Wells *et al.* isolado 9a5c, agente causal da clorose variegada dos citros (SIMPSON *et al.*, 2000). Esta publicação impulsionou as pesquisas de genomas de bactérias fitopatogênicas nos anos seguintes, com o sequenciamento de representantes dos principais gêneros fitopatogênicos (BUELL *et al.*, 2003; BELL *et al.*, 2004; DA SILVA *et al.*, 2002; GOODNER *et al.*, 2001; SALANOUBAT *et al.*, 2002; WOOD *et al.*, 2001;).

Desde os primeiros sequenciamentos genômicos de espécie do gênero *Xanthomonas* (DA SILVA *et al.*, 2002), já foram depositados cerca de 1.500 genomas de espécies integrantes deste gênero no NCBI, os quais são grosseiramente semelhantes. Considerando apenas os genomas com os *status* “completo”, com exceção de *X. albilineans* (Ashby) Dowson, que possui genoma de apenas 3.7 Mb, possivelmente devido a eventos de redução gênica (PIERETTI *et al.*, 2009), a maioria desses genomas possui um cromossomo circular variando de 4.8 Mb a 5.7 Mb, contendo plasmídeo ou não, com conteúdo GC superior a 62% e codificando de 3.166 a 5.135 genes, incluindo de 47 a 59 tRNAs. Esses genomas possuem em comum *clusters* de genes *xps* que codificam para o T2SS; *rpf*, para os fatores de patogenicidade; *hrp* que codifica para o T3SS (com exceção de *X. albilineans*); e os genes *gum*, codificando para síntese do exopolissacarídeo xantana (RYAN *et al.*, 2011).

As primeiras comparações genômicas de espécies de *Xanthomonas* foram realizadas por Da Silva *et al.* (2002), quando compararam os genomas de *X. citri* pv. *citri* (306) e *X. campestris* pv. *campestris* (ATCC33913). Os autores constataram que as espécies compartilham mais de 80% dos genes, com grupos genes relacionados à patogenicidade e processos biológicos, específicos para cada espécie/isolado. Lee *et al.* (2005), constataram eventos de rearranjos entre as espécies *X. citri* pv. *citri*, *X. campestris* pv. *campestris* e *X. oryzae* pv. *oryzae*, além de detectar genes específicos para *X. oryzae* pv. *oryzae*, muitos destes responsáveis pela patogenicidade e especificidade de hospedeiro e alguns com função desconhecida. Para essa mesma bactéria foi verificado elevado número de sequências de inserção e de genes *avr*, comparados com outros

genomas de *Xanthomonas* spp., possivelmente envolvidos no elevado grau de diferenciação de raças da bactéria (OCHIAI *et al.*, 2005). Já para *X. vesicatoria* isolado 85-10 foi observado elevado número de sequências codificantes únicas (n=548) (THIEME *et al.*, 2005).

Comparações interespecies foram realizadas inicialmente usando os isolados 8004 e ATCC33913 de *X. campestris* pv. *campestris* por Qian *et al.* (2005). Os autores mostraram que o isolado 8004 é altamente conservado em relação ao ATCC33913, embora a presença de vários genes específicos do isolado 8004 contribua para diferenças biológicas entre os dois isolados. No mesmo estudo foi verificado que perda e aquisição de blocos de genes estabelecem a principal variação genética entre os isolados da bactéria. Mais tarde, Vorhölter *et al.* (2008) verificaram a presença de um plasmídeo no isolado B100, ao contrário dos isolados ATCC33913 e 8004, e que este isolado possui 496 genes adicionais. Comparando genomas de *X. citri* pv. *citri* e *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* Schaad *et al.* (sin. *X. citri* pv. *aurantifolii* (Schaad *et al.*) Constantin *et al.*) isolados B e C, Moreira *et al.* (2010) também constataram as muitas diferenças no conteúdo gênico entre os genomas, incluindo genes de efetores do T3SS. Diferenças também foram observadas em genes relacionados a formação de biofilme e QS e vários genes relacionados à virulência e patogenicidade ou especificidade de hospedeiro, bem como a presença de 25 grupos de genes flanqueados por elementos de transposição e genes relacionados a fagos, sugerindo uma transferência lateral de genes (MOREIRA *et al.*, 2010).

Estudando o genoma de *X. euvesicatoria* pv. *vesicatoria*, Potnis *et al.* (2011) mostraram que *X. campestris* pv. *vesicatoria* e *X. perforans* são mais relacionadas que *X. citri* pv. *citri*, quanto a organização do T3SS. Além disso, identificaram cinco novos efetores (*xopAO*, *xopG*, *xopAM*, *xopZ2*, *XGA_0724*) de *Xanthomonas*; efetores únicos em *X. perforans* [*xopC2*, *xopAE* e *xopJ4* (*avrXv4*)], responsáveis pela patogenicidade em pimenta; efetores únicos em *X. euvesicatoria* pv. *vesicatoria* [*xopAG* (*avrGf1*) e *xopAI*]; transferência horizontal de genes para *X. gardineri* (*avrA*, *hopAS1* e *avrRpm1*) de *P. syringae* pv. *tomato* (Okabe 1933) Young *et al.* isolado T1 e *P. syringae* pv. *syringae* (Smith & Bryan) Young *et al.* isolado B728; genes de resistência a cobre em *X. euvesicatoria* pv. *vesicatoria* (*copL*, *copA*, *copB*, *copM*, *copG*, *copC*, *copD* e *copF*); de homeostase em todos os isolados (*cohL*, *cohA* e *cohB*); genes únicos representando novos efetores em *X. gardineri* (*xopAO*, *xopAQ*, *xopAS* e *avrBs1*) e genes específicos de cada espécie.

Em estudos genômicos com *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* foi verificado que o gene *xanmn_chr15_0082*, que codifica uma proteína transportadora acil desidratase, parece não ser

funcional nessa bactéria. Isso é devido a um desvio de quadro na posição 110 que resulta numa proteína de 50 aminoácidos em vez dos 95 resíduos reportados para a proteína predita em *X. euvisicatoria*, perdendo sua função em *X. citri* pv. *mangiferaeindicae*, o que poderia explicar o fenótipo apigmentado desta bactéria (ARRIETA-ORTIZ *et al.*, 2013). Isso também foi constatado por Midha e Patil (2014), quando analisaram comparativamente os genomas dos patovares *citri*, *punicae*, *mangiferaeindicae* e *viticola* de *X. citri*, onde em *X. citri* pv. *viticola* foi verificado uma mutação *frameshift* no gene que codifica a fosfotransferase/desidratase e em *X. citri* pv. *mangiferaeindicae*, a presença de um elemento de inserção em três de cada quatro genes do *cluster* necessário para a codificação do pigmento xantomonadina.

Objetivando encontrar os elementos que contribuem para a divergência do hospedeiro de *X. citri* pv. *citri* e *X. arboricola* pv. *pruni* (Smith) Vauterin *et al.*, as quais causam similar sintomas em *Citrus* spp. e *Prunus* spp., respectivamente, Garita-Cambronero *et al.* (2019), verificaram que um conjunto de genes envolvidos em sistemas de detecção ambiental, tais como os transportadores dependentes de *TonB*, os sistemas dos dois componentes e as proteínas de quimiotaxia que aceitam metil, podem estar associados à adaptação desses patógenos a seus hospedeiros. Além disso, verificaram variações no conjunto de genes relacionados com processos de decomposição da parede celular, incluindo enzimas degradantes da parede celular secretadas pelo T2SS e nos efetores do T3SS. Nas variantes patogênicas de 43 isolados de *X. citri*, foram observados eventos de recombinação específica, transferência horizontal de genes e polimorfismo de nucleotídeo único, além de vários genes contendo mutações não sinônimas em relação a genes com funções relacionadas à patogenicidade, bem como diferenças em quatro ilhas gênicas coincidentes com regiões de recombinação e genes de virulência, com pequeno número de genes específicos presentes e/ou ausentes para patótipos específicos que podem explicar as diferenças na gama de hospedeiros e na patogenicidade entre eles (GORDON *et al.*, 2015). Genes únicos de possíveis eventos de transferência horizontal também foram observadas em *X. citri* pv. *mangiferaeindicae*, sugerindo que a presença desses genes pode estar relacionada com virulência e patogenicidade, podendo ser usados para explicar diversos aspectos da biologia desse patógeno, incluindo sua capacidade de colonizar tecidos vasculares e não vasculares do hospedeiro (ARRIETA-ORTIZ *et al.*, 2013).

Estudos comparativos também permitiram verificar que assim como *X. albilineans* e *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. fragariae* Kennedy & King possui genoma consideravelmente reduzido (4,2

Mb) em relação a maioria dos genomas de *Xanthomonas*. O seu genoma não apresenta alteração crítica de *clusters* de genes relacionados à patogenicidade, porém com substancial perda de transportadores TonB-dependentes e enzimas de degradação da parede celular, características que podem explicar estilo de vida endofítico e a associação específica com o hospedeiro (VANDROEMME *et al.*, 2013), como a adaptação de *X. albilineans* aos vasos do xilema e ao seu inseto vetor (PIERETTI *et al.*, 2009). Análises comparativas de sequências genômicas de *Xanthomonas* spp. têm revelado grandes similaridades e diferenças entre as espécies, além da descoberta e esclarecimento das funções de diversos componentes gênicos.

Até o momento, foram identificados múltiplos fatores de virulência que contribuem para a invasão bacteriana em diferentes estágios, como proteínas aderentes, exopolissacarídeo (EPS) e lipopolissacarídeo (LPS), formação de biofilme, sistema de secreção tipo II (T2SS), usado para a secreção de enzimas extracelulares, incluindo xilanase e celulase, e sistema de secreção tipo III, usado para injetar e entregar proteínas efetoras nas células hospedeiras (BÜTTNER; BONAS, 2010; DAS; RANGARAJ; SONTI, 2009; KIM *et al.*, 2009; RAJESHWARI; JHA; SONTI, 2005; RAI *et al.*, 2012).

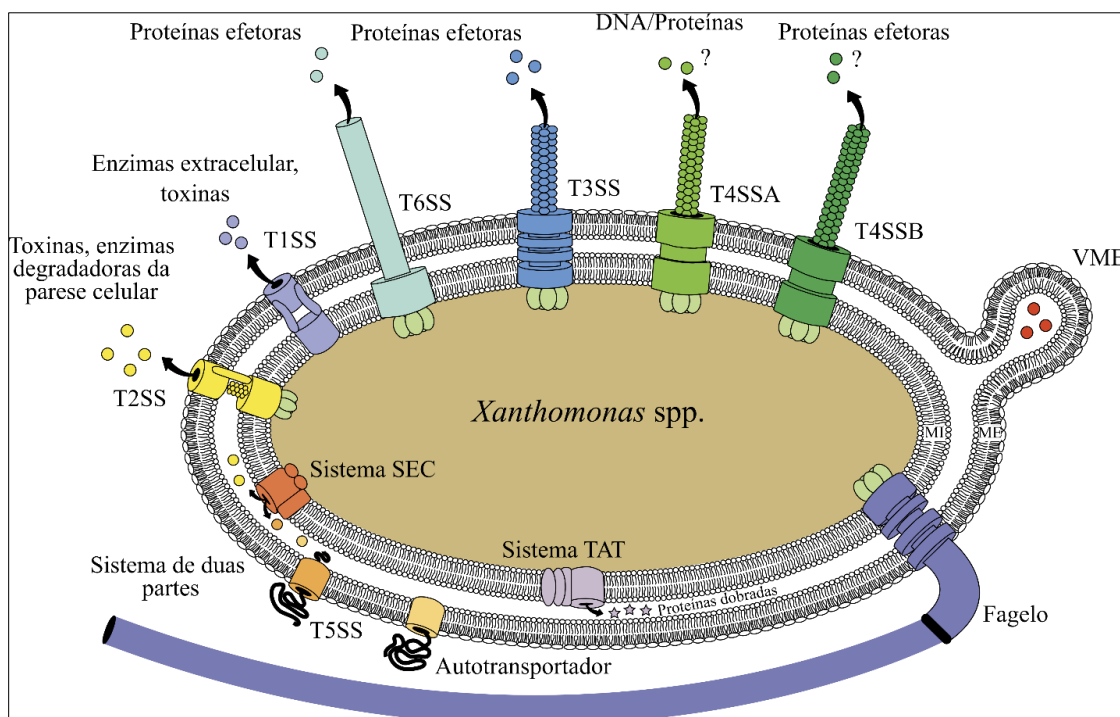
Xanthomonas sp. apresentam seis sistemas de secreção, do tipo I ao VI (GERLACH; HENSEL, 2007) (Figura 2). A avaliação de bibliotecas mutantes geradas pela inserção de transposons e abordagens mutantes direcionadas mostrou que as mutações afetam a virulência bacteriana muitas vezes inativam a função dos sistemas de secreção de proteínas em vez da função das proteínas secretadas individualmente, mostrando a contribuição desses sistemas para a virulência de fitopatógenos (AN *et al.*, 2019; BAPTISTA *et al.*, 2010; BÜTTNER; BONAS, 2010; BÜTTNER; HE, 2010; JHA *et al.*, 2005; SOLÉ *et al.*, 2015;).

O sistema de secreção tipo I (T1SS) compreende um aparato de secreção simples e altamente conservada em bactérias Gram-negativas, responsáveis por translocar uma grande variedade de substratos, incluindo pequenas toxinas a proteínas extremamente grandes para o ambiente extracelular (SMITH; SONDERMANN; O'TOOLE, 2018) (Figura 2). Este sistema é composto por um complexo proteico heterotrimérico que consiste em um transportador de cassete de ligação a ATP na membrana interna (transportador ABC), um canal de proteína na membrana externa e uma proteína de fusão de membrana que liga os componentes interno e externo da membrana (BÜTTNER; BONAS, 2010; GREEN; MECSAS, 2016). A translocação de proteínas pode ocorrer como um mecanismo de uma etapa (NOVAK *et al.*, 2017; THOMAS; HOLLAND;

SCHMITT, 2014) ou através de um intermediário periplásmico (SMITH; SONDERMANN; O'TOOLE, 2018).

Embora não tenha sido atribuída a função direta do T1SS na virulência de *Xanthomonas* spp., este parece ser necessário. Em *X. oryzae* pv. *oryzae* oT1SS está relacionado a obtenção de uma resposta de resistência em plantas de arroz que carregam o gene de resistência à doença *Xa21* (DA SILVA *et al.*, 2004). Oito genes denominados *rax*, necessários para a atividade de AvrXa21 de *X. oryzae* pv. *oryzae* foram identificados através de mutagênese (DA SILVA *et al.*, 2004; SHEN; RONALD, 2002). Destes genes, Rax A, B e C são componentes preditos como parte de um sistema T1SS, *RaxH* e *RaxR* fazem parte de um sistema regulador de dois componentes e *RaxP*, *Q*, *S* e *T* estão envolvidos no metabolismo do enxofre (BURDMAN *et al.*, 2004; DA SILVA *et al.*, 2004; SHEN; RONALD, 2002).

Figura 2: Representação esquemática geral dos sistemas de secreção de proteínas de *Xanthomonas* spp. Seis tipos de sistemas de secreção de proteínas são codificados. Os sistemas de secreção tipo II e tipo V dependem do sistema Sec ou TAT para o transporte de proteínas através da membrana interna. Os sistemas tipo III, tipo IV e tipo VI estão associados a estruturas extracelulares do pilus e, presumivelmente, translocam proteínas para a célula hospedeira. Em alguns casos a secreção de proteínas depende da formação de vesículas da membrana externa. Adaptado de Büttner e Bonas (2010).



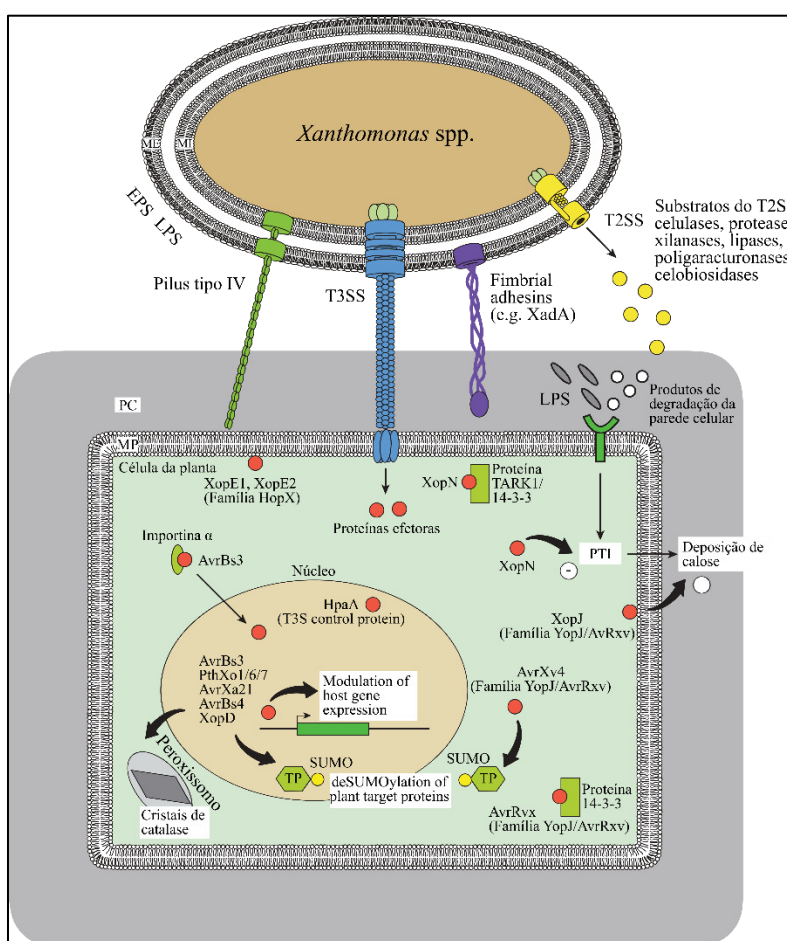
T1SS: Sistema de secreção tipo I; T2SS: Sistema de secreção tipo II; T3SS: Sistema de secreção tipo III; T4SS: Sistema de secreção tipo IIV; T5SS: Sistema de secreção tipo V; T6SS: Sistema de secreção tipo VI; VME: Vesículas da membrana externa; MI: Membrana interna; ME: Membrana externa; TAT: translocação de twin-arginina; SEC: Sistema de Secreção geral.

O sistema de secreção tipo II (T2SS) descrito pela primeira vez em *Klebsiella oxytoca* (Flügge) Lautrop, uma bactéria patogênica a animais, foi identificado em diversas espécies de bactéria Gram-negativas associadas a eucariotos (CIANCIOTTO, 2005; D'ENFERT; RYTER; PUGSLEY, 1987), embora esteja ausente em diversos patógenos de animais e plantas como *Salmonella enterica* (ex Kauffmann & Edwards) Le Minor & Popoff e *Rhizobium radiobacter* (Beijerinck & van Delden) Young *et al.* (sin. *Agrobacterium tumefaciens* Smith & Townsend) (CIANCIOTTO, 2005; GOODNER *et al.*, 2001; WOOD *et al.*, 2001;). Este sistema é utilizado para translocar toxinas e enzimas degradadoras do periplama, através da membrana externa, para o meio extracelular, pelo sistema Sec ou TAT (via de translocação duplo-arginina) (CIANCIOTTO, 2005; JHA; RAJESHWARI; SONTI, 2005; SANDKVIST, 2001) (Figura 2). Toxinas e/ou enzimas secretadas incluem enzimas degradativas extracelulares com diversas funções biológicas, além de toxinas, que coletivamente contribuem para a patogênese bacteriana e/ou virulência de bactérias fitopatogênicas (KOROTKOV *et al.*, 2012).

O T2SS foi descrito inicialmente como um sofisticado mecanismo proteico que contém pelo menos 12 a 15 proteínas diferentes, codificadas em um único operon (SANDKVIST, 2001). Em *Xanthomonas* sp., o T2SS é formado por dois grupamentos gênicos designados *xps* e *xcs*. A função do T2SS na virulência de bactérias fitopatogênicas foi detectada *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, *Erwinia* spp. e *Xanthomonas* spp. (CIANCIOTTO, 2005; SZCZESNY, *et al.*, 2010; JHA *et al.*, 2005). Em *X. campestris* pv. *campestris* e *X. citri* pv. *citri* os dois clusters estão presentes, enquanto *X. oryzae* pv. *oryzae* e *X. oryzae* pv. *oryzicola* (Fang *et al.*) Swings *et al.* apresentam apenas o cluster *xps* (LU *et al.*, 2008). Em *X. campestris* pv. *campestris*, *X. citri* pv. *citri*, *X. oryzae* pv. *oryzae* e *X. vesicatoria* as proteínas secretadas pelos sistemas *xps* incluem enzimas degradadoras da parede celular como celulases, celobiosidases, lipases, xilanases, endoglucanases, poligalacturonases e proteases (DOW *et al.*, 1987; FURUTANI *et al.*, 2004; JHA; RAJESHWARI; SONTI, 2007; RAJESHWARI *et al.*, 2005; RAY; RAJESHWARI; SONTI, 2000; SCHROTER *et al.*, 2001; SUN *et al.*, 2005; SZCZESNY, *et al.*, 2010; WANG; RONG; HE, 2008; YAMAZAKI; HIRATA; TSUYUM, 2008) (Figura 3). Nos patovares de *X. oryzae* o T2SS secreta enzimas hidrolíticas que degradam a parede celular de plantas de arroz como celulases, poligalacturonases e xilanases, que parecem ser essenciais para a patogênese e contribuem para a virulência em arroz (RAJESHWARI *et al.*, 2005; HU *et al.*, 2007; JHA *et al.*, 2007; WANG; RONG; HE, 2008; WANG *et al.*, 2008a). Em *X. vesicatoria* o sistema *xps* contribui para a

virulência da bactéria e translocação de proteínas efetoras do T3SS, enquanto para o sistema *xcs*, não foi observada sua influência na virulência. Entretanto, sugere-se que o sistema *xcs* pode

Figura 3: Representação esquemática dos fatores de virulência de *Xanthomonas* spp. As espécies dependem dos sistemas de secreção tipo II e tipo III, adesinas, exopolissacarídeos (EPS) e lipopolissacarídeos (LPS) para interagir com sucesso com suas plantas hospedeiras. O LPS pode ser liberado da superfície bacteriana e provocar respostas de defesa da planta. Acredita-se que o LPS e outros padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) sejam detectados por receptores específicos do hospedeiro, que ativam as respostas de defesa das plantas (imunidade desencadeada por PAMP - PTI). A PTI também pode ser desencadeada por produtos de degradação da parede celular da planta que resultam da ação de enzimas degradantes secretadas pelo sistema de secreção tipo II. O sistema T3SS, que transloca proteínas efetoras para a célula hospedeira, é essencial para a patogenicidade bacteriana. Proteínas efetoras de *Xanthomonas* spp. com localização e/ou função conhecidas na planta e proteínas associadas na interação identificados são mostrados. A supressão de PTI foi demonstrada para XopN, que interage com as proteínas TARK1 e 14-3-3. Membros da família AvrBs3/PthA modulam a expressão do gene hospedeiro. O efetor AvrBs4 induz cristais de catalase em peroxissomos quando expressos transitoriamente na planta. A cisteína protease XopD e membros da família YopJ/AvrRxv presumivelmente removem SUMO das proteínas-alvo da planta e/ou suprimem a deposição de calos na parede celular da planta, já demonstrado para XopJ. Adaptado de Büttner e Bonas (2010).



ME: Membrana externa; MI: Membrana interna; PC: Parede celular; MP: Membrana plasmática; T2SS: Sistemas de secreção tipo II; T3SS: Sistemas de secreção tipo III; EPS: Exopolissacarídeos; LPS: Lipopolissacarídeos. PTI: Imunidade desencadeada por PAMP

compensar parcialmente a perda de genes homólogos do sistema *xps* (SZCZESNY *et al.*, 2010). Para o cluster *xps* os autores também constataram sua influência na secreção de proteases e xilnases e identificaram a xilanase *XynC* como substrato para o sistema *xps*, além de evidenciar a regulação diferencial do substrato e do sistema. Dessa forma, os substratos do T2SS são responsáveis por degradar os componentes da parede celular das plantas, primeira barreira física contra o ataque de patógenos (Figura 3). Porém, influência direta nos mecanismos de virulência somente foi constatado para uma endoglucanase e uma poligalacturonases de *X. campestris* pv. *campestris*, uma lipase/esterase, uma celulase, uma endoglucanase e uma xilanase de *X. oryzae* pv. *oryzae* (GOUGH *et al.*, 1988; HU *et al.*, 2007; JHA *et al.*, 2007; RAJESHWARI *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2008a, 2008b) e uma xilanase de *X. vesicatoria* (SZCZESNY, *et al.*, 2010). Além disso, os substratos do T2SS parecem não estar apenas associados à virulência bacteriana, mas também podem induzir respostas de defesa basal das plantas, como a deposição de calose na parede celular. No entanto, essa defesa é suprimida em *X. oryzae* pv. *oryzae* com o T3SS funcional (JHA *et al.*, 2007), sugerindo que as proteínas efetoras do T3SS neutralizam a defesa basal das plantas induzida pelos substratos T2SS (BÜTTNER; BONAS, 2010).

O T3SS é um dos principais fatores de patogenicidade da maioria das bactérias (GHOSH, 2004). Nas bactérias fitopatogênicas, este sistema é T3SS é codificado por um grupo de genes cromossômicos denominados *hrp* (do inglês: *hypersensitive response and pathogenicity* - resposta de hipersensibilidade e patogenicidade) (BONAS *et al.*, 1991; KIM *et al.*, 2003), contendo mais de 20 genes organizados em várias unidades de transcrição (BÜTTNER; BONAS, 2002). O aparato central de secreção é conservado entre bactérias patogênicas e está associado a um pilus extracelular *Hrp* em bactéria fitopatogênicas ou uma “agulha” em patógenos de animais, os quais servem como canais de transporte de proteínas secretadas pelo patógeno para a célula do hospedeiro (GHOSH, 2004) (Figura 2). O pilus *Hrp* está conectado a um translocon T3S, um canal transmembranar proteico que é inserido na membrana plasmática eucariótica e auxilia na translocação de proteínas efetoras (BÜTTNER; BONAS, 2002). O T3SS e seus T3E secretados têm sido amplamente estudados por seu papel na hipersensibilidade e patogenicidade. Mutações em um ou mais componentes deste aparato, podem levar a uma perda completa ou a uma redução drástica da patogenicidade, sugerindo que a translocação de proteínas efetoras é presumivelmente crucial para a proliferação bacteriana e a eliciação dos sintomas da doença e pela defesa da defesa do hospedeiro (BÜTTNER E BONAS, 2010; JACQUES *et al.*, 2016) (Figura 3).

Com a exceção de *X. albilineans*, a patogenicidade de *Xanthomonas* depende da presença do T3SS que injeta T3Es bacterianos diretamente na célula hospedeira (JAQUES *et al.*, 2016). Uma vez dentro da célula hospedeira, vários T3Es foram mostrados para suprimir a PTI (GUY *et al.*, 2013). O reconhecimento específico pela planta de um T3E aciona a HR, resultando em imunidade desencadeada por efector (ETI) (Figura 3). Por fim, alguns T3Es demonstraram suprimir a ETI (TEPER *et al.*, 2014). No geral, os T3Es parecem agir sinergicamente ou antagonicamente em diferentes vias da célula hospedeira, criando um status fisiológico do hospedeiro que seria ideal para a proliferação do patógeno (JAQUES *et al.*, 2016).

Até o momento, um total de 78 famílias efetoras foram identificadas junto com três proteínas harpinas, que são proteínas auxiliares ou acessórias que auxiliam na translocação efetiva (<http://www.xanthomonas.org/t3e.html>) (WHITE *et al.*, 2009). Diversos estudos baseados em mutagênese aleatória e direcionada de *Xanthomonas* sp. têm mostrado que mutações deletérias em genes do T3SS anulam a capacidade da bactéria infectar e colonizar o hospedeiro (BONAS, 2000; FACINCANI *et al.*, 2014; FURUTANI *et al.*, 2009; GUO *et al.*, 2011; JACOB *et al.*, 2014; LAIA *et al.*, 2009; LORENZ *et al.*, 2008; LORENZ; HAUSNER; BÜTTNER, 2012; QIAN *et al.*, 2005; ROSSIER; VAN DEN ACKERVEKEN; WANG *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2012; WEBER *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2008;).

Os sistemas de secreção do tipo IV (T4SS) são maquinarias moleculares presentes e usadas por bactérias e arqueias para mediar a transferência de uma variedade de DNAs e proteínas para outras células procarióticas e eucarióticas (Figura 2), contribuindo para a capacidade do patógeno de colonizar o hospedeiro e evitar seu sistema de defesa (BACKERT; MEYER, 2006). Esses sistemas também auxiliam na conjugação bacteriana, se constituindo em fatores essenciais na geração e disseminação de variabilidade em procariotos (JUHAS *et al.*, 2008; SGRO *et al.*, 2019).

Existem cinco tipos funcionais de T4SSs, embora os mesmos compartilhem características comuns, seus processos de evolução os adaptaram para desempenhar funções específicas em cada bactéria (BHATTY *et al.*, 2013). Christie *et al.* (2005) agruparam os T4SSs em três categorias funcionais de acordo com os processos biológicos que mediam. O primeiro tipo (distribuído em grupos de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e em algumas arqueias) é usado para o processo de conjugação, aumentando a plasticidade genômica, auxiliando na adaptação dos microrganismos às mudanças em seu ambiente, como a disseminação de genes de resistência a antibióticos. Esse T4SS é frequentemente codificado em plasmídeos auto transmissíveis,

juntamente com genes que fornecem vantagem seletiva para a célula, como resistência a antibióticos, características de virulência ou outras funções metabólicas que contribuem para a sobrevivência. Eles também podem ser encontrados como parte dos transposons integrados nos cromossomos. Um exemplo típico desse sistema é sistema conjugativo *VirB/VirD4* de *R. radiobacter*. Um segundo tipo de T4SS, encontrado na maioria das bactérias patogênicas de animais e humanos, como os sistema *Dot/Icm* de *Legionella pneumophila* Brenner *et al.* (KUBORI; NAGAI 2016) e *Brucella* sp. (LACERDA; SALCEDO; GORVEL, 2013). Este T4SS é usado para a transferência de proteínas, onde desempenha papéis importantes na virulência, como o estabelecimento de interação patógeno-hospedeiro e/ou a transferência de proteínas efetoras tóxicas ou complexos de proteínas para o citoplasma da célula hospedeira. Um terceiro tipo de T4SS, reportado em poucos espécimes, é responsável pela captação de DNA e a liberação no meio extracelular (processo de transformação), como o sistema *ComB* em *Helicobacter pylori* (MARSHALL *et al.*) Goodwin *et al.* (KARNHOLZ, 2006). Um quarto grupo de T4SS, descoberto em espécies de *Xanthomonas* (ALEGRIA *et al.*, 2005), não está diretamente envolvido em infecções como nos grupos de T4SS descritos acima, mas secreta toxinas para matar outras bactérias Gram-bactérias (SOUZA *et al.*, 2014). Mais recentemente, Zhang *et al.* (2012) baseados em uma análise genômica, propuseram um novo grupo de T4SS presentes nos genomas de bactérias Gram-positivas do gênero *Streptococcus*.

O conhecimento estrutural do T4SS é baseado nos sistemas de secreção de estudos de componentes e complexos individuais de T4SS conjugativos ou de seus homólogos em outros sistemas. Os T4SSs conjugados são compostos por 12 proteínas, *VirB1-VirB11* e *VirD4*, baseadas na nomenclatura do sistema *VirB/D* de *R. radiobacter* (ALVAREZ-MARTINEZ; CHRISTIE, 2009; DARBARI; WAKSMAN, 2015). Eles podem ser estruturalmente divididos em três sub complexos interligados: o complexo de membrana interna, o complexo do núcleo e o pilus externo. O complexo de membranas interno é composto por *VirB3*, *VirB4*, *VirB6*, *VirB8* e *VirD4*, cada um presente em 12 cópias, exceto *VirD4*, onde apenas quatro cópias poderiam ser contadas. O complexo principal é composto por 14 cópias de *VirB7*, *VirB9* e *VirB10* e forma um grande canal no periplasma com a proteína *VirB10* formando o canal da membrana externa e conectando as membranas externa e interna. A transglicosilase *VirB1* facilita a inserção do sistema no espaço periplásmico, quebrando partes da camada peptidoglicana. Fora do envelope bacteriano, o sistema é estendido por um pilus composto por *VirB2* (pilina principal) e *VirB5* (pilina menor). Esse pilus

pode interagir com outras bactérias, com o meio extracelular ou a célula hospedeira.

A bactéria fitopatogênica *R. radiobacter* utiliza o T4SS para transferência de DNA oncogênico (T-DNA) e proteínas efetoras para células vegetais suscetíveis, muitas vezes incitando a doença galha da coroa, que podem destruir espécies agrícolas suscetíveis (CASCALES; CHRISTIE, 2004). Como descrito acima, o T4SS também está presente em *Xanthomonas* spp. Esse sistema compreende o *loci* cromossômico *vir* de 18 kb, descrito inicialmente em *X. citri* (ALEGRIA *et al.*, 2005; BRUNINGS; GABRIEL, 2003; DA SILVA *et al.*, 2002). T4SS não está presente em todas as espécies de *Xanthomonas*. Ortólogos foram identificados em *X. campestris* pv. *campestris* e seus patovares (DA SILVA *et al.*, 2002; QIAN *et al.*, 2005; STUDHOLME *et al.*, 2010; VORHÖLTER *et al.*, 2008) e *X. albilineans* (PIERETTI *et al.*, 2009), estando incompleto em *X. campestris* pv. *vesicatoria* (THIEME *et al.*, 2005). Esse sistema não foi encontrado em genomas de isolados de *X. oryzae* (LEE *et al.*, 2005; OCHIAI *et al.*, 2005; SALZBERG *et al.*, 2008) e *X. citri* pv. *aurantifolii* (MOREIRA *et al.*, 2010).

Foi demonstrado que *X. citri* utiliza seu sistema T4SS para secretar efetores letais para outras espécies bacterianas, de maneira dependente de contato, colocando-os como principais determinantes da aptidão bacteriana da competição interespecie (OLIVEIRA *et al.*, 2016; SGRO *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2015). A importância do efeito antibacteriano de um T4SS semelhante, também foi demonstrada para o patógeno oportunista *Stenotrophomonas maltophilia* (Hugh) Palleroni & Bradbury (BAYER-SANTOS *et al.*, 2019). Estudos com mutantes para genes do T4SS em *X. citri* pv. *citri* (JACOB *et al.*, 2014) e *X. campestris* pv. *campestris* (HE *et al.*, 2007) mostraram que esse sistema não afeta a virulência dessas espécies em seus hospedeiros.

O sistema de secreção do tipo V (T5SS), comumente conhecido como sistema de autotransporte (COSTA *et al.*, 2015), foi descrito pela primeira vez em 1995 por Jahnig e Meyer (1995) estudando a produção da protease *IgA1*. Mais tarde foi demonstrado que o T5SS participa da secreção de diversos fatores de patogenicidade e virulência, incluindo adesinas que participam da adesão de célula a célula e formação de biofilme. O T5SS é dividido em cinco subclasses, denominadas Va - Ve e em comparação com os demais sistemas de secreção, eles são muito menores e compreendem apenas a membrana externa de bactérias Gram-negativas (LEO *et al.*, 2012). O papel do T5SS na patogenicidade e virulência de espécies de *Xanthomonas* foi demonstrado por Gottig *et al.* (2009). Os autores mostraram que uma proteína filamentosa do tipo hemaglutinina está envolvida na virulência e adesão de *X. axonopodis* pv. *citri* (Hasse) Vauterin

et al. (sin. *X. citri* pv. *citri*). Na espécie relacionada *X. fastidiosa*, foi identificada a adesina hemaglutinina similar a classe Vb, consistindo em mais de 3000 resíduos de aminoácidos (VOEGEL *et al.*, 2010), o qual foi mostrado ser importante para a virulência deste patógeno (MATSUMOTO *et al.*, 2012), onde o mutante para o gene *xatA* reduziu significativamente os sintomas da doença de Pierce quando inoculado em videiras.

O Sistema de secreção do tipo VI (T6SS) é uma nanomáquina molecular responsável por proporcionar maior aptidão às bactérias, disparando uma série de proteínas efetoras tóxicas (Figura 2) nas espécies vizinhas concorrentes, determinando as comunidades bacterianas (BAYER-SANTOS *et al.*, 2019). Os T6SSs são formados por um complexo de 13 proteínas que atravessam o envelope celular, formando um complexo estruturalmente semelhante a cauda de bacteriófago invertida (GALÁN, WAKSMAN, 2018). Os genes que codificam o T6SS estão organizados em um ou poucos clusters nos genomas bacterianos, que são comuns nas bactérias Gram-negativas (BOYER *et al.*, 2009; SHRIVASTAVA; MANDE, 2008). O T6SS de *P. putida* (Trevisan) Migula, agente de biocontrole, provoca a morte de bactérias fitopatogênicas após coinfeção da planta, e o T6SS de *R. radiobacter* promove a colonização de plantas, proporcionando uma vantagem competitiva (BERNAL; LLAMAS; FILLOUX, 2018; MA *et al.*, 2014). Além de serem importantes para a virulência, como relatado em hospedeiros mamíferos, o T6SS desempenha papel na sobrevivência bacteriana no ambiente (BAYER-SANTOS *et al.*, 2019; FILLOUX, 2016; HACHANI; WOOD; TRUNK *et al.*, 2018), bem como na aquisição de nutrientes pela secreção de proteínas eliminadoras de metais no meio extracelular (SI *et al.*, 2017a, 2017b).

Apesar de amplamente distribuído em espécies de Xanthomonadales (BAYER-SANTOS *et al.*, 2019), no gênero *Xanthomonas* o T6SS somente foi caracterizado experimentalmente em *X. citri* pv. *citri* e *X. oryzae* pv. *orizycola*. Embora não sendo necessário para *X. citri* pv. *citri* em laranja doce, foi verificado que este é necessário para resistência contra predação pela ameba *Dictyostelium discoideum* Raper presente no solo (BAYER-SANTOS *et al.*, 2018). Acredita-se que o T6SS em *Xanthomonas* pode ser um fator importante para a sobrevivência e disseminação ambiental (BAYER-SANTOS *et al.*, 2019). Em *X. oryzae* pv. *orizycola*, desempenha importante função na inibição do crescimento de outras bactérias (ZHU *et al.*, 2020). Os autores também observaram que o gene *hcp2* over expressado e que a proteína Hcp2 é secretada via o T6SS, e que 25 efetores candidatos, que podem ter função na atividade antimicrobiana de *X. oryzae* pv. *orizycola*, foram preditos via análises de bioinformática.

Predições *in silico* utilizando genomas da ordem Xanthomonadales realizadas por Bayer-Santos *et al.* (2019) identificaram uma série de proteínas com domínios tóxicos conhecidos como supostos efetores do T6SS, sugerindo que os T6SSs de Xanthomonadales exibem propriedades anti-procariotas e anti-eucarióticas, dependendo do grupo filogenético e das espécies bacterianas. Entretanto, diferentemente do que foi comprovado para outras bactérias Gram-negativas, o T6SS em *X. citri* não confere uma vantagem competitiva e a sua atividade antibacteriana é dependente do T4SS (BAYER-SANTOS *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2015).

As células bacterianas possuem a capacidade de detectar e responder a mudanças em suas populações através da comunicação usando pequenas moléculas sinalizadoras, um mecanismo conhecido como *quorum sensing* (QS) (ZHOU *et al.*, 2017). O QS permite que uma população bacteriana controle a expressão de genes principalmente com base em sua densidade ou estágio de crescimento. Nas bactérias patogênicas, o QS aumenta a propensão a infecções bem-sucedidas em vários hospedeiros como resultado da expressão coordenada de genes de virulência de acordo com os níveis populacionais bacterianos (HAM, 2013). Nos últimos anos, diversos estudos identificaram grupos de sinalização via QS possibilitando melhor compreensão das redes de sinalização e avançando significativamente no nosso entendimento sobre a notável capacidade dos microrganismos em modular uma ampla gama de funções biológicas (RUTHERFORD; BASSLER, 2012). Diferentes tipos de molécula de sinal são utilizados por diferentes patógenos bacterianos para QS, das quais se destacam N-Acyl homoserina lactonas (AHLs), oligopeptídeos e moléculas de autoindutor-2 (AI-2) (ROY; ADAMS; BENTLEY, 2011). Em *Xanthomonas* spp., as principais moléculas de sinal QS são os ácidos graxos insaturados, chamados fatores de sinal difusível (DSFs) (DENG *et al.*, 2011; HE; ZHANG, 2008). Novos tipos de moléculas sinalizadoras, como a proteína *Ax21*, têm sido descobertas (HAN; LEE; RONALD, 2011; RONALD, 2011).

O sistema QS presente em *Xanthomonas* spp. normalmente mostra os genes *RpfF*, *RpfC* e *RpfG* no agrupamento de genes *rpf* como os principais componentes de sinalização (DENG *et al.*, 2011; RYAN *et al.*, 2007). O *RpfF* codifica uma enzima chave necessária para a biossíntese de DSF, enquanto o *RpfC* e *RpfG* constituem um sistema de dois componentes envolvidos na percepção e transdução do sinal (HE *et al.*, 2006; SLATER *et al.*, 2002;). Um domínio HD-GYP ativado por *RpfG* possui atividade fosfodiesterase e é capaz de degradar di-GMP cíclico (c-di-GMP), um ligante inibidor do fator de transcrição global *Clp* (ZHOU *et al.*, 2017). Quando ativado,

Clp direciona a expressão de diversos genes, incluindo aqueles que codificam a produção do fator de virulência (TAO; HE, 2010).

Outros fatores contribuindo para o sucesso da patogênese por *Xanthomonas* spp. são os lipopolissacarídeos (LPSs). LPSs são os principais componentes da última camada da membrana externa de bactérias Gram negativas, os quais desempenham um papel vital para o crescimento bacteriano, proporcionando a proteção da célula contra fatores adversos (AN *et al.*, 2019; BÜTTNER; BONAS, 2010) e na adesão e no reconhecimento do hospedeiro (SILIPO *et al.*, 2010) (Figura 3). Em *X. campestris* pv. *campestris* a síntese do LPS é codificada pelo agrupamento de 15 genes denominados genes *wxc* (VORHÖLTER; NIEHAUS; PÜHLER, 2001). A análise de genômica comparativa revelou que grupos de genes LPS de diferentes *Xanthomonas* spp. são variáveis em número e identidade, provavelmente devido a força de seleção diversificadora, gerando alelos diferentes em diversas espécies, patovares e linhagens (LU *et al.*, 2008). Essas variações podem permitir que as bactérias evitem o reconhecimento pelo sistema defesa da planta (HUNG; WU; TSENG, 2002).

LPSs podem atuar como fatores de virulência e induzir respostas de defesa da planta, como expressão gênica relacionada à patogênese, explosão oxidativa e espessamento da parede celular da planta (DOW *et al.*, 2000; MEYER; PUHLER; NIEHAUS, 2001). Foi demonstrado que o LPS de diferentes espécies de *Xanthomonas* induz respostas relacionadas à defesa em plantas hospedeiras e não hospedeiras (MEYER; PUHLER; NIEHAUS, 2001; NEWMAN *et al.*, 2002). Mutantes de *X. oryzae* pv. *oryzicola* deficientes na produção do antígeno O teve a produção de EPS comprometida, além de virulência reduzida (WANG; VINOGRADOV; BOGDANOVE, 2013). Em *X. oryzae* pv. *oryzae* O-antígeno LPS de *X. oryzae* pv. *oryzae* induz respostas de defesa do arroz durante a infecção e que são suprimidas pelo EPS bacteriano (GIRIJA *et al.*, 2017). Esses autores também verificaram que a coinfiltração da goma xantana (EPS) suprimiu a deposição de calose induzida por LPS e que o tratamento de folhas de arroz com um mutante deficiente em EPS indicou que várias funções reguladas pela defesa são sub reguladas durante a infecção. Em *X. campestris* pv. *campestris* e *X. euvesicatoria* pv. *citrumelonis* (SCHAAD *et al.*) Constantin *et al.* (sin. *X. campestris* pv. *citrumelo* Schaad *et al.*), mutações em genes LPS tornaram as bactérias mais suscetíveis a condições ambientais adversas, levando a uma atenuação da virulência do patógeno (ERBS; NEWMAN, 2003).

O EPS xantana é um componente característico presente em todas as espécies de

Xanthomonas, exceto àquelas que apresentam genomas reduzidos nos quais o cluster de genes que o codificam (cluster *gum*) foi perdido (PIERETTI *et al.*, 2009). A produção de xantana é codificada por vários loci genéticos, tendo como principal representante o agrupamento gênico *gum*, o qual consiste em 12 genes (*gumB* a *gumM*) e altamente conservado entre *Xanthomonas* spp. (KATZEN *et al.*, 1998; VOJNOV *et al.*, 1998). A xantana leva à aparência mucóide das colônias bacterianas e devido a essa consistência, protege as bactérias de estresses ambientais como desidratação (BÜTTNER; BONAS, 2010). Por outro lado, em patógenos vasculares, a xantana pode causar a murcha das plantas hospedeiras, bloqueando o fluxo de água nos vasos do xilema (DENNY, 1995).

Os genes *gum* contribuem para a sobrevivência epifítica e/ou crescimento bacteriano na planta de várias *Xanthomonas* spp., como *X. campestris* pv. *campestris*, *X. oryzae* pv. *oryzae* e *X. citri* pv. *citri*, induzindo a formação de sintomas de doenças característicos da doença. No entanto, a contribuição dos genes *gum* para a virulência depende do isolado do patógeno, da planta hospedeira e das condições ambientais. Isolados mutantes de *X. campestris* pv. *campestris* deficientes na biossíntese de xantana reduziram a virulências contra as hospedeiras (KATZEN *et al.*, 1998) e a piruvilação da xantana influenciou sua virulência (BIANCO *et al.*, 2016). Em *X. oryzae* pv. *oryzae* com a interrupção de genes do cluster *gum* foi verificado que a produção de goma xantana foi comprometida e que este componente é essencial, porém não específico, para o desenvolvimento da doença (KIM *et al.*, 2009; VOJNOV *et al.*, 1998). Para *X. citri* pv. *citri*, esses genes são dispensáveis para crescimento bacteriano e formação de sintomas de doença em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, mas contribuem para a virulência bacteriana em *Citrus limon* (L.) Burm (DUNGER *et al.*, 2007; RIGANO *et al.*, 2007).

A xantana também pode ser responsável por suprimir as respostas de defesa das plantas basais, como a deposição de calose na parede celular da planta, presumivelmente por quelação de íons de cálcio divalentes que estão presentes no apoplasto da planta e são necessários para a ativação das respostas de defesa das plantas. Para *X. oryzae* pv. *oryzae*, Girija *et al.* (2017) demonstraram que o componente antígeno O do LPS induziu as respostas de defesa do arroz, as quais foram suprimidas pela xantana, resultando em uma modulação da resposta de defesa da planta hospedeira. A xantana foi descrita suprimindo a imunidade inata induzida por quelação de cálcio em plantas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (ASLAM *et al.*, 2008) e induzindo a suscetibilidade de plantas à *X. campestris* pv. *campestris*, suprimindo a deposição de calose (YUN, 2006).

Quando em contato com a superfície da planta, *Xanthomonas* spp. utilizam várias estratégias de adesão para se fixar, incluindo polissacarídeos de superfície bacteriana (PETROCELLI *et al.*, 2012; VORHÖLTER; NIEHAUS; PUHLER 2001), proteínas de adesão (PRADHAN; RANJAN; CHATTERJEE, 2012) e o pilus do tipo IV (DUNGER *et al.*, 2014; PETROCELLI *et al.*, 2016). Após a ligação inicial, *Xanthomonas* formam estruturas semelhantes a biofilmes. Biofilme é o termo utilizado para descrever uma população bacteriana na qual bactérias se ligam umas às outras ou a superfícies bióticas ou abióticas e são incorporadas em uma matriz polimérica extracelular que consiste principalmente de EPS, proteínas e lipídios (BRANDA *et al.*, 2005; CASTIBLANCO; SUNDIN, 2016; SUTHERLAND, 2001). Presumivelmente, a formação de um biofilme fornece proteção contra antibióticos e respostas de defesa do hospedeiro e pode contribuir para a sobrevivência epifítica bacteriana antes da colonização do espaço intercelular da planta ou para a fixação de bactérias vasculares nos vasos do xilema (STOODLEY *et al.*, 2002). Estruturas semelhantes foram encontradas em uma infinidade de bactérias que habitam a superfície foliar e foi levantada a hipótese de que a criação de um microambiente no biofilme da superfície foliar protege as bactérias de condições de estresse abiótico severo na filosfera (YU *et al.*, 2013).

A xantana foi descrita como um componente-chave para a formação de matriz biofilme em *Xanthomonas* (DOW *et al.*, 2003; RIGANO *et al.*, 2007; TORRES *et al.*, 2007). O biofilme de *Xanthomonas* é uma estrutura dinâmica e sua montagem e dispersão são mediadas pelo fator de sinal difusível (DSF) da molécula de sinal do quorum sensing (AN *et al.*, 2019). Mutações em genes do operon *gum* (*gumB* ao *gumK*) de *X. oryzae* pv. *oryzae* comprometeu a formação de biofilme em *X. citri* pv. *citri* (LI; WANG, 2011a; RIGANO *et al.*, 2007;). Também foi constatado que, além da presença de goma xantana, a formação de biofilme é dependente de *xagABC*, um sistema glicosiltransferase associado a biossíntese de polissacarídeos (LI; WANG, 2012; TAO, SWARUP; ZHANG, 2010). A presença de DNA externo é considerada parte integrante dos biofilmes bacterianos (OKSHEVSKY, REGINA E MEYER, 2011). Em *X. citri*, Sena-Vélez *et al.*, (2015) mostraram que o DNA externo se acumula ao longo do desenvolvimento do biofilme, sendo abundante no biofilme maduro e que, quando tratado com DNAase extracelular a formação de biofilme não foi inibida. Além disso, fatores como LPS da superfície celular e lipoproteínas (LI; WANG, 2011a; LI; WANG 2011b; PETROCELLI *et al.*, 2012; WANG 2012; YAN; HU), flagelo bacteriano e pilus tipo IV (DUNGER, *et al.*, 2014; MALAMUD, *et al.*, 2011) podem ser críticos

para a formação do biofilme de *Xanthomonas*.

1.5. Uso da genômica para taxonomia

A genômica também tem provocado grandes mudanças do campo da taxonomia de procariotos, abrindo um novo caminho para a classificação dinâmica baseada em sistemas. A taxonomia polifásica tradicional baseada em hibridação DNA-DNA (DDH), conteúdo de GC, análise de sequência de genes de rRNA e métodos de tipagem baseados em DNA (AFLP, RFLP) (impressão digital de DNA), que foi utilizada para o delineamento dos táxons por um longo tempo (RADEMAKER *et al.*, 2000; VAN BELKUM *et al.*, 2001), permitem lacunas na definição de espécies que precisam ser preenchidas. A taxonomia baseada no genoma parece ser o elo que faltava e pode preencher a lacuna entre o genoma e a classificação baseada no fenótipo (RAI *et al.*, 2019). Atualmente, a integração de informações genômicas na sistemática microbiana, além de parâmetros fisiológicos e quimiotaxonômicos como critérios taxonômicos, é fortemente recomendada na era pós-genômica (CHUN; RAINEY, 2014).

Nesse contexto, a genômica associada a ferramentas de bioinformática tornou-se uma metodologia promissora, fornecendo um meio reprodutível, confiável e altamente informativo para inferir relações filogenéticas entre procariotos (ROSSELLÓ-MÓRA; AMANN, 2015). Existem diversas evidências experimentais que suportam esta abordagem, que é formada por plataformas de sequenciamento de DNA que geram dados de alto rendimento com baixo custo e alta qualidade, além de adequadas ferramentas de bioinformática para classificação e identificação de procariotos (CHUN *et al.*, 2018).

Diversas abordagens foram desenvolvidas e aplicadas para a substituição da DDH como "o padrão ouro" no delineamento de bactérias por comparações de similaridade genômica como análise ANI (KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2005; RICHTER; ROSSELLÓ-MÓRA, 2009; RIESCO *et al.*, 2018), análise de pangenoma (BEUKES *et al.*, 2017; GOMILA *et al.*, 2017; MEDINI *et al.*, 2005) e, mais recentemente análise *in silico* DDH (dDDH) (GOMILA *et al.*, 2015; GOMILA *et al.*, 2017; MEIER-KOLTHOFF *et al.*, 2013; MONTERO-CALASANZ *et al.*, 2017). A ANI foi empregada pela primeira vez por Konstantinidis e Tiedje (2005), usando a identidade nucleotídica média de todos os genes ortólogos compartilhados entre dois genomas, revelando que as médias resultantes refletiam o grau de distância evolutiva entre os genomas comparados, e um valor de 94% de identidade poderia representar o limite de DDH de 70%. Esse método foi

aprimorado por Goris *et al.* (2007), levando em consideração trechos de DNA de dois genomas, genomas seccionados artificialmente em 1.020 fragmentos de nucleotídeos com independência, independentemente de terem respondido ou não a ORFs reais. No entanto, apesar desse parâmetro parecer ajudar a abraçar as espécies, uma vez que se correlaciona muito bem com o ANI, esse método precisa trabalhar com genomas totalmente sequenciados e não funciona apenas com genomas incompletos. Mais tarde, foi mostrado que a ANI apresenta alta resolução para delimitação de espécies de bactérias e arqueias, utilizando um limiar de 95 a 96% (RICHTER; ROSSELLÓ-MÓRA, 2009). Embora não seja obrigatório para publicação, a inclusão de dados genômicos são altamente recomendados e espera-se que compreendam novas descrições de táxons enviadas ao International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (RAI *et al.*, 2019).

O termo pangenoma foi introduzido pela primeira vez em 2005 e inclui o core do genoma composto por genes compartilhados por todas as linhagens, um genoma dispensável feito de genes presentes em um subconjunto das linhagens e, finalmente, genes específicos da linhagem (MEDINI *et al.*, 2005; VERNIKOS *et al.*, 2015). Como existe uma alta confiabilidade do uso do genoma central para taxonomia bacteriana nos níveis de linhagem, espécie e gênero, e mesmo em níveis taxonômicos mais elevados, o core genoma tem sido amplamente utilizado na genômica comparativa de diversas espécies (COLSTON *et al.*, 2014 ; HESSE *et al.*, 2018; LUGLI *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2015).

A análise *in silico* DDH é baseada na distância entre os genomas obtida pelo método GBDP (*Genome Blast Distance Phylogeny*), que realiza inferência filogenética utilizando genomas completos (HENZ *et al.*, 2005). Posteriormente, essa abordagem foi aprimorada (AUCH *et al.*, 2010; AUCH, KLENK E GÖKER, 2010). A distância entre os genomas é calculada em duas etapas: inicialmente dois genomas A e B são alinhados localmente usando o algoritmo BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990), gerando um conjunto de pares de segmentos de alta pontuação (HSPs), os quais que representam correspondências intergenômicas. Na segunda etapa, as informações contidas nos HSPs (por exemplo, o número total de pares de bases idênticas) são transformadas em um único valor de distância genoma a genoma pelo uso de uma fórmula de distância específica (MEIER-KOLTHOFF *et al.*, 2014). Ao término, árvores filogenéticas podem então ser inferidas a partir de tais matrizes de distância usando métodos padrões, como *neighbour joining* (HENZ *et al.*, 2005).

Avaliações da GBDP para inferir equivalências para valores digitais DDH mostraram que

os resultados da hibridação em laboratório apresentam alta correlações com os valores empíricos obtidos digitalmente (AUCH *et al.*, 2010; AUCH; KLENK; GÖKER, 2010), para genomas completos e incompletos (AUCH *et al.*, 2010). Sendo, portanto, recomendado o uso do limiar de 70% da escala original de dDDH em laboratório. A ANI e a dDDH são os mais amplamente utilizados, e ferramentas como software e serviços web estão disponíveis para uso gratuito (LEE *et al.*, 2016; MEIER-KOLTHOFF *et al.*, 2014; NA *et al.*, 2018; PRITCHARD *et al.*, 2016; RICHTER *et al.*, 2016; RICHTER; ROSSELLÓ-MÓRA, *et al.*, 2009; WU; SCOTT, 2012; YOON *et al.*, 2017). Além disso, tentativas de padronização das abordagens genômicas para taxonomia vêm sendo propostas (BARCO *et al.*, 2020; CHUN *et al.*, 2018; PAUL *et al.*, 2019; PARKS *et al.*, 2018).

Diversos estudos têm demonstrado a utilidade dessas abordagens *in silico* para a delimitação de espécies de bactérias, a nível específico e subespecífico. Meier-Kolthoff *et al.* (2013) utilizando 250 genomas de *Escherichia coli* (Migula) Castellani e Chalmers e mais de 100 gêneros de outras bactérias mostrou que valores de dDDH de 79-80% poderia ser o limiar para delimitação de espécies, além de sugerir cinco subespécies de *E. coli*. No gênero *Pseudomonas* o uso da ANI e GGDC claramente separou isolados de diferentes espécies (GOMILA *et al.*, 2015). Estudando o complexo de espécies de *P. syringae* van Hall, utilizando as mesmas técnicas e pangenômica, Gomila *et al.* (2017) detectaram alta proporção de espécies classificadas erroneamente, além da detecção de pelo menos sete novas espécies.

Para *Xanthomonas* spp., o primeiro estudo mais abrangente foi realizado por Rodriguez-R *et al.* (2012). Utilizando uma abordagem pangenômica, os autores detectaram 989 genes ortólogos nos genomas de 17 espécies de *Xanthomonas* e a filogenia desses genes mostrou a mesma topologia descrita por métodos tradicionais. Além disso, foi verificado que os genomas das espécies de *X. citri* e *X. fuscans* Schaad *et al.* pertenciam a mesma espécie e sugerido que o clado basal constituído por *X. albilineans* deveria ser classificado no gênero *Xylella*. Mais tarde, Constantin *et al.* (2016), estudando genomas de *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, sugeriram uma revisão do complexo *X. axonopodis*, baseado principalmente em DDH e ANI. Além desses estudos, várias revisões e sugestões de novas espécies têm sido propostas (BANSAL, *et al.*, 2019; GAMA *et al.*, 2018; LÓPEZ *et al.*, 2018; STUDHOLME, *et al.*, 2020; TIMILSINA *et al.*, 2019).

O sequenciamento em larga escala de coleções de bactérias fitopatogênicas nos níveis inter e intraespecífico tem revelado uma grande diversidade de genes relacionados à patogênese,

virulência e adaptação ao hospedeiro, bem como proporcionado resolver o posicionamento taxonômico de diversos grupos de procariotos. O sequenciamento genômico de várias espécies e patovares do gênero *Xanthomonas* permitiu análises funcionais que visam compreender a base molecular da virulência, especificidade do hospedeiro e o modo de patogênese, identificando genes envolvidos nesses processos. No entanto, para isolados brasileiros de *X. citri* pv. *viticola* essas análises inexistem. Portanto, os objetivos deste estudo foram: (i) realizar análises de pangenômica e filogenômica de *X. citri* pv. *viticola* e espécies relacionadas; e (ii) realizar análises de genômica comparativa entre isolados brasileiros de *X. citri* pv. *viticola*, com abordagens genômicas para obtenção de informações sobre funções de possíveis genes de patogenicidade, virulência e aplicações de técnicas moleculares para investigar as funções desses genes na virulência da bactéria em plantas de videira.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBURQUERQUE, T. C. S (Coord.). **Uva para exportação: Aspectos técnicos da produção**. Brasília: EMBRAPA/SPI, 1996. 53 p. (Publicações técnicas FRUPEX, n.25)
- ALEGRIA, M. C.; SOUZA, D. P.; ANDRADE, M. O.; DOCENA, C.; KHATER, L.; RAMOS, C. H. I.; DA SILVA, A. C. R.; FARAH, C. S. Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome- and plasmid-encoded type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, p. 2315-2325, 2005.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ALVAREZ-MARTINEZ, C. E.; CHRISTIE, P. J. Biological Diversity of Prokaryotic Type IV Secretion Systems. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 73, p. 775-808, 2009.
- AN, S. Q.; POTNIS, N.; DOW, M.; VORHÖLTER, F. J.; HE, Y. Q.; BECKER, A.; TEPER, D.; LI, Y.; WANG, N.; BLERIS, L.; TANG, J.-L. Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 44, p. 1-32, 2019.
- 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, Seropédica, 2001.
- ARAUJO, J. S. P.; REIS JUNIOR, 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**, Rio de Janeiro, v. 40, p. 305-309, 2005.
- ARAUJO, J. S. P.; ROBBS, C. F. Sintomatologia, patogenicidade e controle do cancro bacteriano da videira (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*) no Brasil. **Agronomia**, Seropédica, v. 34, p. 83-86, 2000.
- ARAÚJO, J. S. P.; ROBBS, C. F.; MACIEL, G. F. Incidência do cancro bacteriano da videira na estação chuvosa do Submédio São Francisco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24 (suplemento), p. 246, 1999.

- ARAUJO, J. S.P.; OLIVEIRA, B. C.; OLIVARES, F. L.; REIS JUNIOR, F. B.; CRUZ, G. B.; ROBBS, C. F.; RIBEIRO, R. L. D. Imunomarcacão de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* com ouro utilizando anticorpos policlonais. **Agronomia**, Seropédica, v. 38, p. 29-33, 2004.
- ASLAM, S. N.; NEWMAN, M.A.; ERBS, G.; MORRISSEY, K. L.; CHINCHILLA, D.; BOLLER, T.; JENSEN, T. T.; CASTRO, C.; IERANO, T.; MOLINARO, A.; JACKSON, R. W.; KNIGHT, M. R. Bacterial Polysaccharides Suppress Induced Innate Immunity by Calcium Chelation. **Current Biology**, Cambridge, v. 18, p. 1078-1083, 2008.
- ATHINUWAT, D.; PRATHUANGWONG, S.; CURSINO, L.; BURR, T. *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* Soybean Cultivar Virulence Specificity Is Determined by avrBs3 Homolog avrXg1. **Phytopathology**, St. Paul, v. 99, p. 996-1004, 2009.
- AUCH, A. F.; JAN, M. VON; KLENK, H. P.; GÖKER, M. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. **Standards in Genomic Sciences**, Michigan, v. 2, p. 117-134, 2010.
- AUCH, A. F.; KLENK, H. P.; GÖKER, M. Standard operating procedure for calculating genome-to-genome distances based on high-scoring segment pairs. **Standards in Genomic Sciences**, Michigan, v. 2, v. 2, p. 142-148, 2010.
- ARRIETA-ORTIZ, M. L.; RODRÍGUEZ-R, L. M.; PÉREZ-QUINTERO, Á. L.; POULIN, L.; DÍAZ, A. C.; ROJAS, N. A.; TRUJILLO, C.; BENAVIDES, M. R.; BART, R.; BOCH, J.; BOUREAU, T.; DARRASSE, A.; DAVID, P.; DE BERNONVILLE, T. D.; FONTANILLA, P.; GAGNEVIN, L.; GUÉRIN, F.; JACQUES, M. A.; LAUBER, E.; LEFEUVRE, P.; MEDINA, C.; MEDINA, E.; MONTENEGRO, N.; BODNAR, A. M.; NOËL, L. D.; ORTIZ, Q.; JUAN F. O.; DANIELA, P. C.; PATIL, P. B.; POUSSIER, S.; PRUVOST, O.; ROBÈNE-SOUSTRADE, I.; RYAN, R. P.; TABIMA, J.; URREGO, M.; OSCAR, G.; VERNIÈRE, C.; CARRERE, S.; VERDIER, V.; SZUREK, B.; RESTREPO, S.; LÓPEZ, C.; KOEBNIK, R.; BERNAL, A. Genomic survey of pathogenicity determinants and VNTR markers in the cassava bacterial pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* strain CIO151. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, p. e79704, 2013.
- BACKERT, S.; MEYER, T. F. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 9, p. 207-217, 2006.
- BANSAL, K.; MIDHA, S.; KUMAR, S.; KAUR, A.; SONTI, R. V.; PATIL, P. B. Ecological and evolutionary insights into pathogenic and non-pathogenic rice associated *Xanthomonas*. **Cold Spring Harbor Laboratory**, New York, 2019. DOI doi.org/10.1101/453373.
- BANSAL, K.; MIDHA, S.; KUMAR, S.; PATIL, P. B. Ecological and evolutionary insights into *Xanthomonas citri* pathovar diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 83, p. e02993-16, 2017.
- BAPTISTA, J. C.; MACHADO, M. A.; HOMEM, R. A.; TORRES, P. S.; VOJNOV, A. A.; AMARAL, A. M. DO. Mutation in the xpsD gene of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* affects cellulose degradation and virulence. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 1, p. 146-153, 2010.
- BARCO, R. A.; GARRITY, G. M.; SCOTT, J. J.; AMEND, J. P.; NEALSON, K. H.; EMERSON, D. A Genus Definition for Bacteria and Archaea Based on a Standard Genome Relatedness Index. **Ecological and Evolutionary Science**, Washington, v. 11, p. e02475-19, 2020.
- BAYER-SANTOS, E.; DEMORAES CESETI, L.; FARAH, C. S.; ALVAREZ-MARTINEZ, C. E. Distribution, function and regulation of type 6 secretion systems of Xanthomonadales. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 10, p. 1635, 2019.
- BELKUM, A. VAN; STRUELENS, M.; VISSER, A. DE; VERBRUGH, H.; TIBAYRENC, M. Role of Genomic Typing in Taxonomy, Evolutionary Genetics, and Microbial Epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, p. 547-560, 2001.

BELL, K. S.; SEBAIHIA, M.; PRITCHARD, L.; HOLDEN, M. T.; HYMAN, L. J.; HOLEVA, M. C.; THOMSON, N. R.; BENTLEY, S. D.; CHURCHER, L. J.; MUNGALL, K.; ATKIN, R.; BASON, N.; BROOKS, K.; CHILLINGWORTH, T.; CLARK, K.; DOGGETT, J.; FRASER, A.; HANCE, Z.; HAUSER, H.; JAGELS, K.; MOULE, S.; NORBERTCZAK, H.; ORMOND, D.; PRICE, C.; QUAIL, M. A.; SANDERS, M.; WALKER, D.; WHITEHEAD, S.; SALMOND, G. P.; BIRCH, P. R.; PARKHILL, J.; TOTH, I. K. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, p. 11105-10, 2004.

BERNAL, P.; LLAMAS, M. A.; FILLOUX, A. Type VI secretion systems in plant-associated bacteria. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 20, p. 1-15, 2018.

BEUKES, C. W.; PALMER, M.; MANYAKA, P.; CHAN, W. Y.; AVONTUUR, J. R.; VAN ZYL, E.; HUNTEMANN, M.; CLUM, A.; PILLAY, M.; PALANIAPPAN, K.; VARGHESE, N.; MIKHAILOVA, N.; STAMATIS, B.; REDDY, T. B. K.; DAUM, C.; SHAPIRO, N.; MARKOWITZ, V.; IVANOVA, N.; KYRPIDES, N.; WOYKE, T.; BLOM, J.; WHITMAN, W. B.; VENTER, S. N.; STEENKAMP, E. T. Genome Data Provides High Support for Generic Boundaries in *Burkholderia Sensu Lato*. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, p. 1154, 2017.

BHATTY, M.; LAVERDE GOMEZ, J. A.; CHRISTIE, P. J. The expanding bacterial type IV secretion lexicon. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 164, p. 620-639, 2013.

BIANCO, M. I.; TOUM, L.; YARYURA, P. M.; MIELNICHUK, N.; GUDESBLAT, G. E.; ROESCHLIN, R.; MARANO, M. R.; IELPI, L.; VOJNOV, A. A. Xanthan Pyruvilation Is Essential for the Virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI**, St. Paul, v. 29, p. 688-699, 2016.

BONAS, U. hrp genes of phytopathogenic bacteria. In: Dangl, J. L. (ed.). **Bacterial pathogenesis of plants and animals**. 1st. ed. New Delhi: Thomson Press, 1994, p. 79-98.

BONAS, U.; SCHULTE, R.; FENSELAU, S.; MINSAVAGE, G. V.; STASKAWICZ, B. J.; STALL, R. E. Isolation of a gene-cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. **Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI**, St. Paul, v. 4, p. 81-88, 1991

BOULANGER, A.; NOËL, L. D. *Xanthomonas* Whole Genome Sequencing: Phylogenetics, Host Specificity and Beyond. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, p. 1100, 2016.

BOYER, F.; FICHANT, G.; BERTHOD, J.; VANDENBROUCK, Y.; ATTREE, I. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? **BMC Genomics**, London, v. 10, p. 104, 2009.

BRADBURY, J. F. Genus II *Xanthomonas* Dowson 1939. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 1. ed. London: Williams and Wilkins, 1984, p. 199-210.

BRANDA, S. S.; VIK, Å.; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 13, p. 20-26, 2005.

BRASIL. **Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento/Secretaria de defesa agropecuária**. Instrução Normativa Nº 38, de 1º de outubro de 2018, 2018. Disponível em: < http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/43461167/do1-2018-10-02-instrucao-normativa-n-38-de-1-de-outubro-de-2018-43461024>. Acesso em: 15 ago. 2020.

BRASIL. **Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento/Secretaria de defesa agropecuária**. Instrução normativa nº 2, de 6 de fevereiro de 2014. Disponível em: < http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/sanidade-vegetal/arquivos-prevencao/IN2_2014CancrodaVideira.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2020.

BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 4, p. 141-34157, 2003.

BUELL, C. R.; JOARDAR, V.; LINDEBERG, M.; SELENGUT, J.; PAULSEN, I. T.; GWINN, M. L.; DODSON, R. J.; DEBOY, R. T.; DURKIN, A. S.; KOLONAY, J. F.; MADUPU, R.; DAUGHERTY, S.; BRINKAC, L.; BEANAN, M. J.; HAFT, D. H.; NELSON, W. C.; DAVIDSEN, T.; ZAFAR, N.; ZHOU, L.; LIU, J.; YUAN, Q.; KHOURI, H.; FEDOROVA, N.; TRAN, B.; RUSSELL, D.; BERRY, K.; UTTERBACK, T.; VAN AKEN, S. E.; FELDBLYUM, T. V.; D'ASCENZO, M.; DENG, W. L.; RAMOS, A. R.; ALFANO, J. R.; CARTINHO, S.; CHATTERJEE, A. K.; DELANEY, T. P.; LAZAROWITZ, S. G.; MARTIN, G. B.; SCHNEIDER, D. J.; TANG, X.; BENDER, C. L.; WHITE, O.; FRASER, C. M.; COLLMER. The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, p. 10181-6, 2003.

BUENSANTEAI, N. **Identification, development of detection method and survey of bacterial necrosis disease of grapevine in Thailand**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciência da Tecnologia em culturas vegetais) - Universidade de Tecnologia em Suranaree, Muang District, 2004.

BURDMAN, S.; SHEN, Y.; LEE, S.-W.; XUE, Q.; RONALD, P. RaxH/RaxR: A Two-Component Regulatory System in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Required for AvrXa21 Activity. **Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI**, St. Paul, v. 17, p. 602-612, 2004.

BÜTTNER, D.; BONAS, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 34, p. 107-133, 2010.

BÜTTNER, D.; BONAS, U. Getting across - Bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. **EMBO Journal**, London, v. 21, p. 5313-5322, 2002.

BUTTNER, D.; NENNSTIEL, D.; KLUSENER, B.; BONAS, U. Functional Analysis of HrpF, a Putative Type III Translocon Protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 184, p. 2389-2398, 2002.

CASCALES, E.; CHRISTIE, P. J. Definition of a Bacterial Type IV Secretion Pathway for a DNA Substrate. **Science**, Washington, v. 304, p. 1170-1173, 2004.

CASTIBLANCO, L. F.; SUNDIN, G. W. New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria: Molecular regulation of biofilm formation. **Journal of Integrative Plant Biology**, Carlton South, v. 58, p. 362-372, 2016.

CHAND, R. Sources of resistance to grapevine bacterial canker disease in *Vitis*. **Vitis**, Siebeldingen, v. 31, p. 83-86, 1992.

CHAND, R.; KISHUN. Outbreak of grapevine bacterial canker disease in India. **Vitis**, Siebeldingen, v. 188, p. 183-188, 1990.

CHAND, R.; PATIL, B.P.; KISHUM, R. Efficacy of different chemicals against grape - vine bacterial canker disease. **Indian Journal of Plant Protection**, New Delhi, v. 20, p. 108-110, 1991.

CHRISTIE, P. J.; ATMAKURI, K.; KRISHNAMOORTHY, V.; JAKUBOWSKI, S.; CASCALES, E. Biogenesis, Architecture, and Function of Bacterial Type Iv Secretion Systems. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 59, p. 451-485, 2005.

CHUN, J.; OREN, A.; VENTOSA, A.; CHRISTENSEN, H.; ARAHAL, D. R.; COSTA, M. S. DA; ROONEY, A. P.; YI, H.; XU, X. W.; DE MEYER, S.; TRUJILLO, M. E. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. **International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 68, p. 461-466, 2018.

- CHUN, J.; RAINEY, F. A. Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 64, p. 316-324, 2014.
- CIANCIOTTO, N. P. Type II secretion: A protein secretion system for all seasons. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 13, p. 581-588, 2005.
- COLSTON, S. M.; FULLMER, M. S.; BEKA, L.; LAMY, B.; GOGARTEN, J. P.; GRAF, J. Bioinformatic Genome Comparisons for Taxonomic and Phylogenetic Assignments Using *Aeromonas* as a Test Case. **mBio**, Washington, v. 5, p. e02136-14, 2014.
- CONSTANTIN, E. C.; CLEENWERCK, I.; MAES, M.; BAEYEN, S.; VAN MALDERGHEM, C.; DE VOS, P.; COTTYN, B. Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. **Plant Pathology**, Oxford, v. 65, p. 792-806, 2016.
- COSTA, T. R. D.; FELISBERTO-RODRIGUES, C.; MEIR, A.; PREVOST, M. S.; REDZEJ, A.; TROKTER, M.; WAKSMAN, G. Secretion systems in Gram-negative bacteria: Structural and mechanistic insights. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 13, p. 343-359, 2015.
- D'ENFERT, C.; RYTER, A.; PUGSLEY, A. P. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Klebsiella pneumoniae* genes for production, surface localization and secretion of the lipoprotein pullulanase. **The EMBO Journal**, London, v. 6, p. 3531-3538, 1987.
- DA SILVA, A. C.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGI, O. R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VAN SLUYS, M. A.; ALMEIDA, N. F.; ALVES, L. M.; DO AMARAL, A. M.; BERTOLINI, M. C.; CAMARGO, L. E.; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOZO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L. P.; CICALI, R. M.; COUTINHO, L. L.; CURSINO-SANTOS, J. R.; EL-DORRY, H.; FARIA, J. B.; FERREIRA, A. J.; FERREIRA, R. C.; FERRO, M. I.; FORMIGHIERI, E. F.; FRANCO, M. C.; GREGGIO, C. C.; GRUBER, A.; KATSUYAMA, A. M.; KISHI, L. T.; LEITE, R. P.; LEMOS, E. G.; LEMOS, M. V.; LOCALI, E. C.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A. M.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; MARTINS, E. C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C. F.; MIYAKI, C. Y.; MOON, D. H.; MOREIRA, L. M.; NOVO, M. T.; OKURA, V. K.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, V. R.; PEREIRA, H. A.; ROSSI, A.; SENA, J. A.; SILVA, C.; DE SOUZA, R. F.; SPINOLA, L. A.; TAKITA, M. A.; TAMURA, R. E.; TEIXEIRA, E. C.; TEZZA, R. I.; SANTOS, T. M.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; WHITE, F. F.; SETUBAL, J. C.; KITAJIMA, J. P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, London, v. 417, p. 459-463, 2002.
- DARBARI, C. V.; WAKSMAN, G. Structural Biology of Bacterial Type IV Secretion Systems. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 84, p. 603-629, 2015.
- DARRASSE, A. et al. Genome sequence of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* strain 4834-R reveals that flagellar motility is not a general feature of xanthomonads. **BMC Genomics**, London, v. 14, 2013.
- DAS, A.; RANGARAJ, N.; SONTI, R. V. Multiple Adhesin-Like Functions of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Are Involved in Promoting Leaf Attachment, Entry, and Virulence on Rice. **Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI**, v. 22, p. 73-85, 2009.
- DELANNOY, E.; LYON, B. R.; MARMEY, P.; JALLOUL, A.; DANIEL, J. F.; MONTILLET, J. L.; ESSENBERG, M.; NICOLE, M. Resistance of Cotton Towards *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 63-82, 2005.
- DENG, Y.; WU, J.; TAO, F.; ZHANG, L. H. Listening to a new language: DSF-based quorum sensing in gram-negative bacteria. **Chemical Reviews**, Washington, v. 111, p. 160-179, 2011.
- DENNY, T. P. Involvement of Bacterial Polysaccharides in Plant Pathogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 33, p. 173-197, 1995.

- DOW, J. M.; CROSSMAN, L.; FINDLAY, K.; HE, Y.-Q.; FENG, J.-X.; TANG, J.-L. Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 100, p. 10995-11000, 2003.
- DOW, J. M.; FENG, J. X.; BARBER, C. E.; TANG, J. L.; DANIELS, M. J. Novel genes involved in the regulation of pathogenicity factor production within the *rpf* gene cluster of *Xanthomonas campestris*. **Microbiology**, Reading, v. 146, p. 885-891, 2000.
- DOW, J. M.; SCOFIELD, G.; TRAFFORD, K.; TURNER, P. C.; DANIELS, M. J. A gene cluster in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* required for pathogenicity controls the excretion of polygalacturonate lyase and other enzymes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 31, p. 261-271, 1987.
- DUNGER, G.; GUZZO, C. R.; ANDRADE, M. O.; JONES, J. B.; FARAH, C. S. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* type IV pilus is required for twitching motility, biofilm development, and adherence. **Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI**, v. 27, p. 1132-1147, 2014.
- DUNGER, G.; RELING, V. M.; TONDO, M. L.; BARRERAS, M.; IELPI, L.; ORELLANO, E. G.; OTTADO, J. Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 188, p. 127-135, 2007.
- DYE, D.W. *Xanthomonas*. In: SCHAAD, N.E. (ed.). **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. St. Paul: APS Press. 1980. p.45-49.
- ERBS, G.; NEWMAN, M.-A. The role of lipopolysaccharides in induction of plant defence responses. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 4, p. 421-425, 2003.
- FACINCANI, A. P.; MOREIRA, L. M.; SOARES, M. R.; FERREIRA, C. B.; FERREIRA, R. M.; FERRO, M. I. T.; FERRO, J. A.; GOZZO, F. C.; DE OLIVEIRA, J. C. F. Comparative proteomic analysis reveals that T3SS, Tfp, and xanthan gum are key factors in initial stages of *Citrus sinensis* infection by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Functional and Integrative Genomics**, Berlin, v. 14, p. 205-217, 2014.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAOSTAT**, 2020. Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> >. Acesso em: 10 ago. 2020.
- FERREIRA, M. A. S. V.; BONNEAU, S.; BRIAND, M.; CESBRON, S.; PORTIER, P.; DARRASSE, A.; GAMA, M. A. S.; BARBOSA, M. A. G.; MARIANO, R. DE L. R.; SOUZA, E. B.; JACQUES, M. A. *Xanthomonas citri* pv. *viticola* affecting grapevine in Brazil: Emergence of a successful monomorphic pathogen. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 10, p. 1-18, 2019.
- FERREIRA-TONIN, M. **Caracterização taxonômica de espécies do gênero *Xanthomonas***. 2012, 80 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2012.
- FIETTO, J. L. R.; MACIEL, T. E. F. Sequenciando genomas. In: MOREIRA, L. M. (ed.). **Ciências genômicas: fundamentos e aplicações**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 2015, p. 27-64.
- FIGURSKI, D. H.; HELINSKI, D. R. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 76, p. 1648-1652, 1979.
- FLEISCHMANN, R. D.; ADAMS, M. D.; WHITE, O.; CLAYTON, R. A.; KIRKNESS, E. F.; KERLAVAGE, A. R.; BULT, C. J.; TOMB, J. F.; DOUGHERTY, B. A.; MERRICK, J. M. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae*, **Science**, Washington, v. 269, p. 496-512, 1995.
- FREIRE, F. C. O.; OLIVEIRA, A. D. S. Ocorrência do cancro bacteriano da videira no estado do Ceará. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 25, p. 26-27, 1999.

FREIRE, F. C. O.; OLIVEIRA, A. D. S. **Ocorrência do cancro bacteriano da videira no estado do Ceará**, 2001. Disponível em: <http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_2495.pdf>. Acesso em: 11 Maio 2020.

FURUTANI, A.; TAKAOKA, M.; SANADA, H.; NOGUCHI, Y.; OKU, T.; TSUNO, K.; OCHIAI, H.; TSUGE, S. Identification of Novel Type III Secretion Effectors in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI**, St. Paul, v. 22, p. 96-106, 2009.

FURUTANI, A.; TSUGE, S.; OHNISHI, K.; HIKICHI, Y.; OKU, T.; TSUNO, K.; INOUE, Y.; OCHIAI, H.; KAKU, H.; KUBO, Y. Evidence for HrpXo-Dependent Expression of Type II Secretory Proteins in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 186, p. 1374-1380, 2004.

GALÁN, J. E.; WAKSMAN, G. Protein-Injection Machines in Bacteria. **Cell**, Cambridge, v. 172, p. 1306-1318, 2018.

GAMA, M. A. S.; MARIANO, R. L.R.; SILVA JÚNIOR, W.1 J.; FARIAS, A. R. G.; BARBOSA, M. A. G.; FERREIRA, M. A. S. S. V.; COSTA JÚNIOR, C. R. L.; SANTOS, L. A.; SOUZA, E. B. Taxonomic Repositioning of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 as *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 comb. nov. and Emendation of the Description of *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* to Include Pigmented Isolates Pathogenic to Cashew Plant. **Phytopathology**, St. Paul, v. 108, p. 1143-1153, 2018.

GARITA-CAMBRONERO, J.; SENA-VÉLEZ, M.; FERRAGUD, E.; SABUQUILLO, P.; REDONDO, C.; CUBERO, J. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*: Comparative analysis of two pathogens producing similar symptoms in different host plants. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 14, p. e0219797, 2019.

GERLACH, R. G.; HENSEL, M. Protein secretion systems and adhesins: The molecular armory of Gram-negative pathogens. **International journal of medical microbiology: IJMM**, Jena, v. 297, p. 401-415, 2007.

GHOSH, P. Process of Protein Transport by the Type III Secretion System. **Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR**, Washington v. 68, p. 771-795, 2004.

GIRIJA, A. M.; KINATHI, B. K.; MADHAVI, M. B.; RAMESH, P.; VUNGARALA, S.; PATEL, H. K.; SONTI, R. V. Rice Leaf Transcriptional Profiling Suggests a Functional Interplay Between *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Lipopolysaccharide and Extracellular Polysaccharide in Modulation of Defense Responses During Infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI**, St. Paul, v. 30, p. 16-27, 2017.

GOMILA, M.; BUSQUETS, A.; MULET, M.; GARCÍA-VALDÉS, E.; LALUCAT, J. Clarification of taxonomic status within the *Pseudomonas syringae* species group based on a phylogenomic analysis. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, n. 8, p. 2422, 2017.

GOMILA, M.; PEÑA, A.; MULET, M.; LALUCAT, J.; GARCIA-VALDÉS, E. Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, n. 6, p. 2014, 2015.

GOODNER, B.; HINKLE, J.; GATTUNG, MILLER, N.; BLANCHARD, M.; QUROLLO, B.; GOLDMAN, B. S.; CAO, Y.; ASKENAZI, M.; HALLING, C.; MULLIN, L.; HOUMIEL, K.; GORDON, J.; VAUDIN, M.; IARTCHOUK, O.; EPP, A.; LIU, F.; WOLLAM, C.; ALLINGER, M.; DOUGHTY, D.; SCOTT, C.; LAPPAS, C.; MARKELZ, B.; FLANAGAN, C.; CROWELL, C.; GURSON, J.; LOMO, C.; SEAR, C.; STRUB, G.; CIELO, C.; SLATE, S. Genome Sequence of the Plant Pathogen and Biotechnology Agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. **Science**, Washington, v. 294, p. 2323-2328, 2001.

GORDON, J. L.; LEFEUVRE, P.; ESCALON, A.; BARBE, V.; CRUVEILLER, S.; GAGNEVIN, L.; PRUVOST, O. Comparative genomics of 43 strains of *Xanthomonas citri* pv. *citri* reveals the evolutionary events giving rise to pathotypes with different host ranges. **BMC Genomics**, London, v. 16, 2015.

GORIS, J.; KONSTANTINIDIS, K. T.; KLAPPENBACH, J. A.; COENYE, T.; VANDAMME, P.; TIEDJE, J. M.

- DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, p 81-91, 2007.
- GOUGH, C. L.; DOW, J.; M.; BARBER, C. E.; DANIELS, M. J. Cloning of two endoglucanase genes of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: analysis of the role of the endoglucanase in pathogenesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI**, St. Paul, v. 1, p. 275-281, 1998.
- GREEN, E. R.; MECSAS, J. Bacterial Secretion Systems - An overview. **Microbiology spectrum**, Washington, v. 4, p. 1-32, 2016.
- GUO, Y.; FIGUEIREDO, F.; JONES, J.; WANG, N. HrpG and HrpX play global roles in coordinating different virulence traits of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI**, St. Paul, v. 24, p. 649-661, 2011.
- GUO, Y.; SAGARAM, U. S.; KIM, J. S.; WANG, N. Requirement of the galU gene for polysaccharide production by and pathogenicity and growth in planta of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, p. 2234-2242, 2010.
- GÜRTLER, V.; MAYALL, B. C. Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 3-16, 2001.
- GUY, E.; GENISSEL, A.; HAJRI, A.; CHABANNES, M.; DAVID, P.; CARRERE, S.; LAUTIER, N.; ROUX, B.; BOUREAU, T.; ARLAT, M.; POUSSIER, S.; NOËL, L. D. Natural Genetic Variation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Pathogenicity on *Arabidopsis* Revealed by Association and Reverse Genetics. **mBio**, Washington. v. 4, p. e00538-12, 2013.
- HACHANI, A.; WOOD, T. E.; FILLOUX, A. Type VI secretion and anti-host effectors. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 29, p. 81-93, 2016.
- HALFELD-VIEIRA, B.; NECHET, K. Bacterial canker of grapevine in Roraima, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasilia, v. 31, p. 604, 2006.
- HAM, J. H. Intercellular and intracellular signalling systems that globally control the expression of virulence genes in plant pathogenic bacteria: Signalling systems of plant pathogenic bacteria. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 14, p. 308-322, 2013.
- HAN, S.-W.; LEE, S.-W.; RONALD, P. C. Secretion, modification, and regulation of Ax21. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 14, p. 62-67, 2011.
- HAYWARD, A. C. **The hosts of *Xanthomonas***. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. (eds.). *Xanthomonas*, London: Chapman & Hall, 1993, p. 1-119.
- HE, Y. Q.; ZHANG, L.; JIANG, B. L.; ZHANG, Z. C.; XU, R. Q.; TANG, D. J.; QIN, J.; JIANG, W.; ZHANG, X.; LIAO, J.; CAO, J. R.; ZHANG, S. S.; WEI, M. L.; LIANG, X. X.; LU, G. T.; FENG, J. X.; CHEN, B.; CHENG, J.; TANG, J. L. Comparative and functional genomics reveals genetic diversity and determinants of host specificity among reference strains and a large collection of Chinese isolates of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Genome Biology**, London, v. 8, p. 1-26, 2007.
- HE, Y. W.; ZHANG, L. H. Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 32, p. 842-857, 2008.
- HE, Y.-W.; WANG, C.; ZHOU, L.; SONG, H.; DOW, J. M.; ZHANG, L.-H. Dual Signaling Functions of the Hybrid Sensor Kinase RpfC of *Xanthomonas campestris* Involve Either Phosphorelay or Receiver Domain-Protein Interaction. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 281, p. 33414-33421, 2006.
- HENZ, S. R.; HUSON, D. H.; AUCH, A. F.; NIESELT-STRUWE, K.; SCHUSTER, S. C. Whole-genome

prokaryotic phylogeny. **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, p. 2329-2335, 2005.

HESSE, C.; SCHULZ, F.; BULL, C. T.; SHAFFER, B. T.; YAN, Q.; SHAPIRO, N.; HASSAN, K. A.; VARGHESE, N.; ELBOURNE, L. D. H.; PAULSEN, I. T.; KYRPIDES, N.; WOYKE, T.; LOPER, J. E. Genome-based evolutionary history of *Pseudomonas* spp. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 20, p. 2142-2159, 2018.

HUNG, C.-H.; WU, H.-C.; TSENG, Y.-H. Mutation in the *Xanthomonas campestris* xanA Gene Required for Synthesis of Xanthan and Lipopolysaccharide Drastically Reduces the Efficiency of Bacteriophage ϕ L7 Adsorption. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 291, p. 338-343, 2002.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Disponível em:

<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp?t=4&z=t&o=26&u1=27&u2=27&u3=1&u4=4>>. Acesso em 11 ago. 2020.

JACOB, T. R.; DE LAIA, M. L.; MOREIRA, L. M.; GONÇALVES, J. F.; CARVALHO, F. M. D. S.; FERRO, M. I. T.; FERRO, J. A. Type IV secretion system is not involved in infection process in citrus. **International Journal of Microbiology**, Nasr City, v. 2014. DOI 10.1155/2014/763575

JACQUES, M. A.; ARLAT, M.; BOULANGER, A.; BOUREAU, T.; CARRÈRE, S.; CESBRON, S.; CHEN, N. W.; COCIANCICH, S.; DARRASSE, A.; DENANCÉ, N.; FISCHER-LE SAUX, M.; GAGNEVIN, L.; KOEBNIK, R.; LAUBER, E.; NOËL, L. D.; PIERETTI, I.; PORTIER, P.; PRUVOST, O.; RIEUX, A.; ROBÈNE, I.; ROYER, M.; SZUREK, B.; VERDIER, V.; VERNIÈRE, C. Using Ecology, Physiology, and Genomics to Understand Host Specificity in *Xanthomonas*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 4, n. 54, p. 163-87, 2016.

JALAN, N.; YAN, Q.; KOGENARU, S.; GUO, Y.; JONES, J. B.; GRAHAM, J. H.; WANG, N. Genomics of *Xanthomonas citri* and Related Species. In: GROSS, D. C.; LICHENS-PARK, A.; KOLE, C. (eds.). **Genomics of Plant-Associated Bacteria**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 151-176, 2014.

JHA, G.; RAJESHWARI, R.; SONTI, R. V. Bacterial type two secretion system secreted proteins: Double-edged swords for plant pathogens. **Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI**, St. Paul, v. 18, p. 891–898, 2005.

JHA, G.; RAJESHWARI, R.; SONTI, R. V. Functional Interplay Between Two *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Secretion Systems in Modulating Virulence on Rice. **Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI**, St. Paul, v. 20, p. 31-40, 2007.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323–329, 2006.

JUHAS, M.; CROOK, D. W.; HOOD, D. W. Type IV secretion systems: Tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 10, p. 2377-2386, 2008.

JOSE, J.; JÄHNIG, F.; MEYER, T. F. Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 18, p. 378-380, 1995.

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. **Anais [...]**. Rio de Janeiro: SBF/UENF/UFRRJ, p. 323.

KAMBLE, A. K.; SAWANT, S. D.; SAHA, S.; SAWANT, I. S. Screening of Grapevine Germplasm to Identify Sources of Resistance to Bacterial Leaf Spot Causing *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **International Journal of Agriculture Innovations and Research**, Akola, v. 5, p. 2319-1473, 2017.

KAMOUN S, KAMDAR HV, TOLA E, KADO CL. Incompatible interactions between crucifers and *Xanthomonas campestris* involve a vascular hypersensitive response: role of the hrpX locus. **Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI**, St. Paul, v. 5, p. 22-33, 1992

KATZEN, F.; FERREIRO, D. U.; ODDO, C. G.; IELMINI, M. V.; BECKER, A.; PÜHLER, A.; IELPI, L. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: Effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, p. 1607-1617, 1998.

KIM, J.-G.; PARK, B. K.; YOO, C.-H.; JEON, E.; OH, J.; HWANG, I. Characterization of the *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* Hrp Pathogenicity Island. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, p. 3155-3166, 2003.

KIM, S. Y.; KIM, J. G.; LEE, B. M.; CHO, J. Y. Mutational analysis of the gum gene cluster required for xanthan biosynthesis in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 31, p. 265-270, 2009.

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

KONSTANTINIDIS, K. T.; TIEDJE, J. M. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 102, p. 2567-2572, 2005.

KOROTKOV, K. V.; SANDKVIST, M.; HOL, W. G. J. The type II secretion system: Biogenesis, molecular architecture and mechanism. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 10, p. 336-51, 2012.

KUBORI, T.; NAGAI, H. The Type IVB secretion system: an enigmatic chimera. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 29, p. 22-29, 2016.

KUROWSKI, C.; CONN, K.; HIMMEL, P. **CPPSI Collaboration for Plant Pathogen Strain Identification. Guideline for identification of pepper bacterial leaf spot races using differential hosts**. Disponível em: <<http://cppsi.ucanr.edu/files/225903.pdf>>. Acesso em: 22 ago. 2020.

LACERDA, T. L. S.; SALCEDO, S. P.; GORVEL, J.-P. Brucella T4SS: the VIP pass inside host cells. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 16, p. 45-51, 2013.

LAIA, M. L.; MOREIRA, L. M.; DEZAJACOMO, J.; BRIGATI, J. B.; FERREIRA, C. B.; FERRO, M. I.; SILVA, A. C.; FERRO, J. A.; OLIVEIRA, J. C. New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. **BMC Microbiology**, London, v. 9, n. 12, p. 1-17, 2009.

LAZZAROTTO, J. J.; FIORAVANÇO, J. C. Tendências e sazonalidades nas exportações e importações brasileiras de uva de mesa. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 43, p. 43-58, 2013.

LEÃO, P. C. DE S.; BRANDÃO, E. O.; GONÇALVES, N. P. DA S. Caracterização agrônômica e molecular do clone Itália Muscat no submédio do Vale do São Francisco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 33, p. 297-302, 2011.

LEAO, P. C. de S. (Ed.). **Cultivo da videira**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2004. 89 p.

LEE, B. M.; PARK, Y. J.; PARK, D. S.; KANG, H. W.; KIM, J. G.; SONG, E. S.; PARK, I. C.; YOON, U. H.; HAHN, J. H.; KOO, B. S.; LEE, G. B.; KIM, H.; PARK, H. S.; YOON, K. O.; KIM, J. H.; JUNG, C. H.; KOH, N. H.; SEO, J. S.; GO, S. J. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. **Nucleic Acids Research**, London, v. 33, p. 577-586, 2005

LEE, I.; KIM, Y. O.; PARK, S. C.; CHUN, J. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading v. 66, p. 1100-1103, 2016.

LEO, J. C.; GRIN, I.; LINKE, D. Type V secretion: Mechanism(S) of autotransport through the bacterial outer membrane. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, London, v. 367, n. 1592, p. 1088-1101, 2012.

- LI, J.; WANG, N. Genome-wide mutagenesis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* reveals novel genetic determinants and regulation mechanisms of biofilm formation. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, p. e21804, 2011a.
- LI, J.; WANG, N. The wxacO gene of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* encodes a protein with a role in lipopolysaccharide biosynthesis, biofilm formation, stress tolerance and virulence. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 12, p. 381-396, 2011b.
- LI, J.; WANG, N. The gpsX gene encoding a glycosyltransferase is important for polysaccharide production and required for full virulence in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **BMC Microbiology**, London, v. 12, p. 31, 2012.
- LIMA, M. F. **Cancro bacteriano da videira, causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*: Epidemiologia e manejo**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2000. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPATSA/8855/1/CTE54.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2020.
- PEREIRA, G. E.; ARAÚJO, A. J. B.; SANTOS, DE O. J.; OLIVEIRA S.V.; NASCIMENTO, R. L.; QUINTINO, C.; VANDERLINDE, R.; LIMA, L. L. A. Chemical and aromatic characteristics of Brazilian tropical wines. **Acta Horticulturae**, Leuven, v.91, p.135-140, 2011.
- LIMA, M. F.; FERREIRA, M. A. S. V.; MOREIRA, W. A.; DIANESE, J. C. Bacterial canker of grapevine in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 3, p. 440-43, 1999.
- LIMA, M.F.; MOREIRA, W.A. **Uva de mesa: Fitossanidade (Frutas do Brasil)**. Doenças causadas por bactérias. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002, 114 p.
- LIMA, N. B.; GAMA, M. A. S.; MARIANO, R. L. R.; SILVA, W. J.; FARIAS, A. R. G.; FALCÃO, R. M.; SOUSA-PAULA, L. C.; BENKO-ISEPPON, A. M.; PAIVA, S. S. L.; BALBINO, V. Q.; SOUZA, E. B. Complete Genome Sequence of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* Strain CCRMXCV 80 from Brazil. **Genome Announcements**, Washington, v. 5, p. e01263-17, 2017.
- LOPES, D. B.; NASCIMENTO, A. R. P. **Situação atual do cancro bacteriano da videira no Semi-árido nordestino**: Seminário Novas Perspectivas Para o Cultivo de Uvas Sem Sementes no Vale do São Francisco. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2004. 9 p. (Documento 185).
- LÓPEZ, M. M.; LOPEZ-SORIANO, P.; GARITA-CAMBRONERO, J.; BELTRÁN, C.; TAGHOUTI, G.; PORTIER, P.; CUBERO, J.; FISCHER-LE SAUX, M.; MARCO-NOALES, E. *Xanthomonas prunicola* sp. nov., a novel pathogen that affects nectarine (*Prunus persica* var. nectarina) trees. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 68, p. 1857-1866, 2018.
- LORENZ, C.; HAUSNER, J.; BÜTTNER, D. HrcQ Provides a Docking Site for Early and Late Type III Secretion Substrates from *Xanthomonas*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, p. e51063, 2012.
- LORENZ, C.; SCHULZ, S.; WOLSCH, T.; ROSSIER, O.; BONAS, U.; BÜTTNER, D. HpaC controls substrate specificity of the *Xanthomonas* type III secretion system. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 4, p. e1000094, 2008.
- LU, H.; PATIL, P.; SLUYS, M-A. V.; WHITE, F.; RYAN, R. P.; DOW, J.; RABINOWICZ, P.; SALZBERG, S. L.; LEACH, J. E.; SONTI, R.; BRENDDEL, V.; BOGDANOVA, A. J. Acquisition and evolution of plant pathogenesis-associated gene clusters and candidate determinants of tissue-specificity in *Xanthomonas*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 3, p. e3828, 2008.
- LUGLI, G. A.; MILANI, C.; DURANTI, S.; MANCABELLI, L.; MANGIFESTA, M.; TURRONI, F.; VIAPPANI, A.; SINDEREN, D. VAN; VENTURA, M. Tracking the Taxonomy of the Genus *Bifidobacterium* Based on a Phylogenomic Approach. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 84, p. e02249-17, 2017.
- MA, L. S.; HACHANI, A.; LIN, J. S.; FILLOUX, A.; LAI, E. M. *Agrobacterium tumefaciens* deploys a superfamily

of type VI secretion DNase effectors as weapons for interbacterial competition in planta. **Cell Host and Microbe**, Cambridge, v. 16, p. 94-104, 2014.

MALAMUD, F.; TORRES, P. S.; ROESCHLIN, R.; RIGANO, L. A.; ENRIQUE, R.; BONOMI, H. R.; CASTAGNARO, A. P.; MARANO, M. R.; VOJNOV, A. A. The *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development. **Microbiology**, Reading, v. 157, p. 819-829, 2011.

MALAVOLTA JÚNIOR, 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, p. 373-376, 2003

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

MALAVOLTA JUNIOR., 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**, Botucatu, 1999;25:262- 264.

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

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

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

MATSUMOTO, A.; HUSTON, S. L.; KILLINY, N.; IGO, M. M. XatA, an AT-1 autotransporter important for the virulence of *Xylella fastidiosa* Temecula1. **MicrobiologyOpen**, Oxford, v. 1, p. 33-45, 2012.

MEDINI, D.; DONATI, C.; TETTELIN, H.; MASIGNANI, V.; RAPPUOLI, R. The microbial pan-genome. **Current Opinion in Genetics & Development**, London, v. 15, p. 589-594, 2005.

MEIER-KOLTHOFF, J. P.; AUCH, A. F.; KLENK, H. P.; GÖKER, M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. **BMC Bioinformatics**, London, v. 14, p. 1-14, 2013b.

MEYER, A.; PÜHLER, A.; NIEHAUS, K. The lipopolysaccharides of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* induce an oxidative burst reaction in cell cultures of *Nicotiana tabacum*. **Planta**, Berlin, v. 213, p. 21-222, 2001.

MEIER-KOLTHOFF, J. P.; HAHNKE, R. L.; PETERSEN, J.; SCHEUNER, C.; MICHAEL, V.; FIEBIG, A.; ROHDE, C.; ROHDE, M.; FARTMANN, B.; GOODWIN, L. A.; CHERTKOV, O.; REDDY, T.; PATI, A.; IVANOVA, N. N.; MARKOWITZ, V.; KYRPIDES, N. C.; WOYKE, T.; GÖKER, M.; KLENK, H. P. Complete genome sequence of DSM 30083T, the type strain (U5/41T) of *Escherichia coli*, and a proposal for delineating subspecies in microbial taxonomy. **Standards in Genomic Sciences**, Michigan, v. 9, p. 1-19, 2014.

MEYER, A.; PÜHLER, A.; NIEHAUS, K. The lipopolysaccharides of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* induce an oxidative burst reaction in cell cultures of *Nicotiana tabacum*. **Planta**, Berlin, v. 213, p. 214-222, 2001. 0

MIDHA, S.; PATIL, P. B. Genomic insights into the evolutionary origin of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and its ecological relatives. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 80, p. 6266–6279, 2014.

MONTERO-CALASANZ, M. DEL C.; MEIER-KOLTHOFF, J. P.; ZHANG, D.-F.; YARAMIS, A.; ROHDE, M.; WOYKE, T.; KYRPIDES, N. C.; SCHUMANN, P.; LI, W.-J.; GÖKER, M. Genome-Scale Data Call for a Taxonomic Rearrangement of Geodermatophilaceae. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, p. 2501, 2017.

MOREIRA, L. M.; ALMEIDA, N. F.; POTNIS, N.; DIGIAMPIETRI, L. A.; ADI, S. S.; BORTOLOSSI, J. C.; DA SILVA, A. C.; DA SILVA, A. M.; DE MORAES, F. E.; DE OLIVEIRA, J. C.; SOUZA, R. F.; FACINCANI, A. P.; FERRAZ, A. L.; FERRO, M. I.; FURLAN, L. R.; GIMENEZ, D. F.; JONES, J. B.; KITAJIMA, E. W.; LAIA, M. L.; LEITE JÚNIOR, R. P.; NISHIYAMA, M. Y.; NETO, J. R.; NOCITI, L. A.; NORMAN, D. J.; OSTROSKI, E. H.; PEREIRA JÚNIOR, H. A.; STASKAWICZ, B. J.; TEZZA, R. I.; FERRO, J. A.; VINATZER, B. A.; SETUBAL, J. C. Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. **BMC Genomics**, London, v. 11, 2008.

NA, S.-I.; KIM, Y. O.; YOON, S.-H.; HA, S.; BAEK, I.; CHUN, J. UBCG: Up-to-date bacterial core gene set and pipeline for phylogenomic tree reconstruction. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 56, p. 280-285, 2018.

NASCIMENTO, A. R. P., MICHEREFF, S. J., MARIANO, R. L. R. E 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, p. 1-7, 2006.

NASCIMENTO, A. R. P.; MARIANO, R. L. R. Cancro bacteriano da videira: etiologia, epidemiologia e medidas de controle. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, p. 301-07, 2004.

NAUE, C. R.; COSTA, V.; BARBOSA, M.; BATISTA, D. C.; SOUZA, E. B.; MARIANO, R. *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* on grapevine cutting tools and water: Survival and disinfection. **Journal of Plant Pathology**, Portici, v. 96, p. 451-458, 2014a.

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, p. 2-6, 2005b.

NAUE, CARINE ROSA; BARBOSA, M. A. G.; BATISTA, D. DA C.; SOUZA, E. B. DE; MARIANO, R. DE L. R. Efeito do tratamento de bacelos de videira “Red Globe” no controle do cancro bacteriano causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, p. 853-861, 2014.

NAYUDU, M. V. Incitant of a New Bacterial Disease of Grape. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 73, p. 183-186, 1972.

NEWMAN, M.-A.; ROEPENACK-LAHAYE, E. VON; PARR, A.; DANIELS, M. J.; DOW, J. M. Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria. **The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology**, Oxford, v. 29, p. 487-495, 2002.

NOVAK, J.; CERNY, O.; OSICKOVA, A.; LINHARTOVA, I.; MASIN, J.; BUMBA, L.; SEBO, P.; OSICKA, R. Structure–Function Relationships Underlying the Capacity of Bordetella Adenylate Cyclase Toxin to Disarm Host Phagocytes. **Toxins**, Basel, v. 9, n. 10, p. 300, 2017.

OCHIAI, H.; INOUE, Y.; TAKEYA, M.; SASAKI, A.; KAKU, H. Genome Sequence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Suggests Contribution of Large Numbers of Effector Genes and Insertion Sequences to Its Race Diversity. **Japan Agricultural Research Quarterly**, Tsukuba, v. 39, p. 275-287, 2005.

OLIVEIRA, L. C.; SOUZA, D. P.; OKA, G. U.; LIMA, F. DA S.; OLIVEIRA, R. J.; FAVARO, D. C.; WIENK, H.; BOELEN, R.; FARAH, C. S.; SALINAS, R. K. VirB7 and VirB9 Interactions Are Required for the Assembly and Antibacterial Activity of a Type IV Secretion System. **Structure**, London, v. 24, p. 1707-1718, 2016.

OKSHEVSKY, M.; REGINA, V. R.; MEYER, R. L. Extracellular DNA as a target for biofilm control. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 33, p. 73-80, 2015.

- PANDEY, A.; SONTI, R. V. Role of the FeoB Protein and Siderophore in Promoting Virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* on Rice. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 192, p. 3187–3203, 2010.
- PARKINSON, N.; COWIE, C.; HEENEY, J.; STEAD, D. Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, p. 264-274, 2009.
- PARKS, D. H.; CHUVOCHINA, M.; WAITE, D. W.; RINKE, C.; SKARSHEWSKI, A.; CHAUMEIL, P.-A.; HUGENHOLTZ, P. A Standardized Bacterial Taxonomy Based on Genome Phylogeny Substantially Revises the Tree of Life. **Nature Biotechnology**, New York, v.36, p. 996-1004, 2018.
- PARTE, A. C. LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 68, p. 1825–1829, 2018.
- PAUL, B.; DIXIT, G.; MURALI, T. S.; SATYAMOORTHY, K. Genome-based taxonomic classification. **Genome**, Ottawa, v. 62, p. 45-52, 2019.
- PEDRO JÚNIOR, M. J.; SENTELHAS, P. C. Clima e produção. In: POMMER, C. V. (ed.). **Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003. p. 63-107.
- 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, p. 161-164, 2007.
- PEIXOTO, A. R.; MARIANO, R. L. R.; MOREIRA, J. O. T. Hospedeiros alternativos de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira**, Viçosa, v. 31 (suplemento), p. S250, 2006.
- PETROCELLI, S.; ARANA, M. R.; CABRINI, M. N.; CASABUONO, A. C.; MOYANO, L.; BELTRAMINO, M.; MOREIRA, L. M.; COUTO, A. S.; ORELLANO, E. G. Deletion of *pilA*, a Minor Pilin-Like Gene, from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Influences Bacterial Physiology and Pathogenesis. **Current Microbiology**, New York, v. 73, p. 904-914, 2016.
- PETROCELLI, S.; TONDO, M. L.; DAURELIO, L. D.; ORELLANO, E. G. Modifications of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Lipopolysaccharide Affect the Basal Response and the Virulence Process during Citrus Canker. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, p. e40051, 2012.
- PIERETTI, I.; ROYER, M.; BARBE, V.; CARRERE, S.; KOEBNIK, R.; COCIANCICH, S.; COULOUX, A.; DARRASSE, A.; GOUZY, J.; JACQUES, M.-A.; LAUBER, E.; MANCEAU, C.; MANGENOT, S.; POUSSIER, S.; SEGURENS, B.; SZUREK, B.; VERDIER, V.; ARLAT, M.; ROTT F. The complete genome sequence of *Xanthomonas albilineans* provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited Xanthomonadaceae. **BMC Genomics**, London, v. 10, p. 1-15, 2009.
- POTNIS, N.; KRASILEVA, K.; CHOW, V.; ALMEIDA, N. F.; PATIL, P. B.; RYAN, R. P.; SHARLACH, M.; BEHLAU, F.; DOW, J. M.; MOMOL, M.; WHITE, F. F.; PRESTON, J. F.; VINATZER, B. A.; KOEBNIK, R. SETUBAL, J. C.; NORMAN, D. J.; STASKAWICZ, B. J.; JONES, J. B. Comparative genomics reveals diversity among xanthomonads infecting tomato and pepper. **BMC Genomics**, London, v. 12, 2011.
- PRADHAN, B. B.; RANJAN, M.; CHATTERJEE, S. XadM, a Novel Adhesin of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Exhibits Similarity to Rhs Family Proteins and Is Required for Optimum Attachment, Biofilm Formation, and Virulence. **Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI**, St. Paul, v. 25, p. 1157–1170, 2012.
- PRESTON, G.; STUDHOLME, D.; CALDELARI, I. Profiling the secretomes of plant pathogenic Proteobacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 29, p. 331-360, 2005.
- PRITCHARD, L.; GLOVER, R. H.; HUMPHRIS, S.; ELPHINSTONE, J. G.; TOTH, I. K. Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: Soft-rotting enterobacterial plant pathogens. **Analytical Methods**, Cambridge, v. 8,

p. 12-24, 2016.

QIAN, G.; ZHANG, Y.; ZHOU, Y.; LIU, C.; ZHAO, Y.; SONG, Z.; FAN, J.; HU, B.; LIU, F. epv, Encoding a Hypothetical Protein, Is Regulated by DSF-Mediating Quorum Sensing as Well as Global Regulator Clp and Is Required for Optimal Virulence in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 102, p. 841-847, 2012.

QIAN, W.; JIA, Y.; REN, S. X.; HE, Y. Q.; FENG, J. X.; LU, L. F.; SUN, Q.; YING, G.; TANG, D. J.; TANG, H.; WU, W.; HAO, P.; WANG, L.; JIANG, B. L.; ZENG, S.; GU, W. Y.; LU, G.; RONG, L.; TIAN, Y.; YAO, Z.; FU, G.; CHEN, B.; FANG, R.; QIANG, B.; CHEN, Z.; ZHAO, G. P.; TANG, J. L.; HE, C. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 15, p. 757-67, 2005

RADEMAKER, J. L. W.; HOSTE, B.; LOUWS, F. J.; KERSTERS, K.; SWINGS, J.; VAUTERIN, L.; VAUTERIN, P.; DE BRUIJN, F. J. 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, p. 665-677, 2000.

RAI, A.; SMITA, I. N.; DEEPSHIKHA, G.; GAURAV, K.; DHANESH, K.; SURESH, G.; RAMANA, C. V. Emerging Concepts in Bacterial Taxonomy. In: SATYANARAYANA, T.; JOHRI, B. N.; DAS, S. K. (eds.). **Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications**. Springer Nature Singapore Pte Ltd. p. 3-22, Hyderabad, Telangana, India, 2019.

RAI, R.; RANJAN, M.; PRADHAN, B. B.; CHATTERJEE, S. Atypical Regulation of Virulence-Associated Functions by a Diffusible Signal Factor in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI**, St. Paul, v. 25, p. 789-801, 2012.

RAJESHWARI, R.; JHA, G.; SONTI, R. V. Role of an In Planta-Expressed Xylanase of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Promoting Virulence on Rice. **Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI**, St. Paul, v. 18, p. 830-837, 2005.

RYAN, R. P.; FOUHY, Y.; LUCEY, J. F.; JIANG, B. LE; HE, Y. Q.; FENG, J. X.; TANG, J. L.; DOW, J. M. Cyclic di-GMP signalling in the virulence and environmental adaptation of *Xanthomonas campestris*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 63, p. 429-442, 2007.

RAY, S. K.; RAJESHWARI, R.; SONTI, R. V. Mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* deficient in general secretory pathway are virulence deficient and unable to secrete xylanase. **Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI**, St. Paul, v. 13, p. 394-401, 2000.

RICHTER, F. R.; COOPER, R. A.; BAYS, P. M.; SIMONS, J. S. Distinct neural mechanisms underlie the success, precision, and vividness of episodic memory. **eLife**, Cambridge, v. 5, p. e18260, 2016.

RICHTER, M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 106, p. 19126-31, 2009.

RIESCO, R.; CARRO, L.; ROMÁN-PONCE, B.; PRIETO, C.; BLOM, J.; KLENK, H.-P.; NORMAND, P.; TRUJILLO, M. E. Defining the Species *Micromonospora saelicesensis* and *Micromonospora noduli* Under the Framework of Genomics. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 25, p. 1360, 2018.

RIGANO, L. A.; SICILIANO, F.; ENRIQUE, R.; SENDÍN, L.; FILIPPONE, P.; TORRES, P. S.; QÜESTA, J.; DOW, J. M.; CASTAGNARO, A. P.; VOJNOV, A. A.; MARANO, M. R. Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI**, St. Paul, v. 20, p. 1222-1230, 2007.

RODRIGUES NETO, J.; DESTÉFANO, S. A. L.; RODRIGUES, L. M. R.; PELLOSO, D. S.; OLIVEIRA JÚNIOR,

- L. DA C. Grapevine bacterial canker in the State of São Paulo, Brazil: detection and eradication. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, v. 36, p. 42-44, 2011.
- RODRIGUEZ-R, L. M.; GRAJALES, A.; ARRIETA-ORTIZ, M. L.; SALAZAR, C.; RESTREPO, S.; BERNAL, A. Genomes-based phylogeny of the genus *Xanthomonas*. **BMC Microbiology**, London, v. 12, p. 43, 2012.
- RONALD, P.C. Small protein-mediated quorum sensing in a gram-negative bacterium: novel targets for control of infectious disease. **Discovery Medicine**, Baltimore, v. 12, p. 461-470, 2011
- ROSSELLÓ-MÓRA, R.; AMANN, R. Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 38, p. 209-216, 2015.
- ROSSIER, O.; VAN DEN ACKERVEKEN, G.; BONAS, U. HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 38, p. 828-838, 2000.
- ROY, V.; ADAMS, B. L.; BENTLEY, W. E. Developing next generation antimicrobials by intercepting AI-2 mediated quorum sensing. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 49, p. 113-123, 2011.
- RUTHERFORD, S. T.; BASSLER, B. L. Bacterial quorum sensing: Its role in virulence and possibilities for its control. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, Woodbury, v. 2, p. a012427, 2012.
- RYAN, R. P.; VORHÖLTER, F.-J.; POTNIS, N.; JONES, J. B.; VAN SLUYS, M.-A.; BOGDANOVA, A. J.; DOW, J. M. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 9, p. 344-55, 2011.
- SALANOUBAT, M.; GENIN, S.; ARTIGUENAVE, F.; GOUZY, J.; MANGENOT, S.; ARLAT, M.; BILLAULT, M.; BROTTIER, P.; CAMUS, J. C.; CATTOLICO, L.; CHANDLER, M.; CHOISNE, N.; CLAUDEL-RENARD, C.; CUNNAC, S.; DEMANGE, N.; GASPIN, C.; LAVIE, M.; MOISAN, A.; ROBERT, C.; SAURIN, W.; SCHIEX, T.; SIGUIER, P.; THÉBAULT, P.; WHALEN, M.; WINCKER, P.; LEVY, M.; WEISSENBACH, J.; BOUCHER, C. A. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. **Nature**, London, v. 415, p.497-502, 2002.
- SALZBERG, S. L.; SOMMER, D. D.; SCHATZ, M. C.; PHILLIPPY, A. M.; RABINOWICZ, P. D.; TSUGE, S.; FURUTANI, A.; OCHIAI, H.; DELCHER, A. L.; KELLEY, D.; MADUPU, R.; PUIU, D.; RADUNE, D.; SHUMWAY, M.; TRAPNELL, C.; APARNA, G.; JHA, G.; PANDEY, A.; PATIL, P. B.; ISHIHARA, H.; MEYER, D. F.; SZUREK, B.; VERDIER, V.; KOEBNIK, R.; DOW, J. M.; RYAN, R. P.; HIRATA, H.; TSUYUMU, S.; LEE, W. S.; SEO, Y. S.; SRIARIYANUM, M.; RONALD, P. C.; SONTI, R. V.; VAN SLUYS, M. A.; LEACH, J. E.; WHITE, F. F.; BOGDANOVA, A. J. Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99A. **BMC Genomics**, London, v. 9, p. 2014, 2008.
- SANDKVIST, M. Biology of type II secretion. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 40, p. 271-283, 2001.
- SANTOS, M. M.; PEIXOTO, A. R.; PESSOA, E. DE S.; GAMA, M. A.; MARIANO, R. DE L. R.; BARBOSA, M. A. G.; PAZ, C. D. DA; PAZ, C. D. DA. Identificação de potenciais plantas hospedeiras alternativas de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, p. 595-598, 2014.
- SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G. H.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P. E.; STROMBERG, V. K.; VIDAVER, A. K. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 29, p. 690-695, 2006.
- SCHROTER, K.; FLASCHEL, E.; PUHLER, A.; BECKER, A. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* secretes the endoglucanases ENGXCA and ENGXCB: construction of an endoglucanase deficient mutant for industrial xanthan production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 55, p. 727-233, 2001.
- SENA-VÉLEZ, M.; REDONDO, C.; GELL, I.; FERRAGUD, E.; JOHNSON, E.; GRAHAM, J. H.; CUBERO, J.

Biofilm formation and motility of *Xanthomonas* strains with different citrus host range. **Plant Pathology**, Oxford, v. 64, p. 767-775, 2015.

SGRO, G. G.; OKA, G. U.; SOUZA, D. P.; CENENS, W.; BAYER-SANTOS, E.; MATSUYAMA, B. Y.; BUENO, N. F.; DOS SANTOS, T. R.; ALVAREZ-MARTINEZ, C. E.; SALINAS, R. K.; FARAH, C. S. Bacteria-killing type IV secretion systems. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 10, p. 1-20, 2019.

SHEN, Y. PING; ZOU, L. FANG; LI, Y. RONG; ZOU, H. SONG; LIU, X. LING; CHEN, G. YOU. Xoryp_08180 of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, encoding a Hypothetical Protein, is Regulated by HrpG and HrpX and Required for Full Virulence in Rice. **Journal of Integrative Agriculture**, Beijing, v. 11, p. 600–610, 2012.

SHEN, Y.; RONALD, P. Molecular determinants of disease and resistance in interactions of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and rice. **Microbes and Infection**, New York, v. 4, p. 1361-1367, 2002.

SHIVANANDA JAMBENAL, M. R. R.; HIREMANI, N.; HIREMANI, N. Basic studies on *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* causing bacterial leaf spot of grape and evaluated in-vitro efficacy of different chemicals and bioagents against its growth. **International Journal of Plant Protection**, Muzaffarnagar, v. 4, p. 397-401, 2011.

SHRIVASTAVA, S.; MANDE, S. S. Identification and Functional Characterization of Gene Components of Type VI Secretion System in Bacterial Genomes. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 3, p. e2955, 2008.

SI, M.; WANG, Y.; ZHANG, B.; ZHAO, C.; KANG, Y.; BAI, H.; WEI, D.; ZHU, L.; ZHANG, L.; DONG, T. G.; SHEN, X. The Type VI Secretion System Engages a Redox-Regulated Dual-Functional Heme Transporter for Zinc Acquisition. **Cell Reports**, Cambridge, v. 20, p. 949-959, 2017.

SI, M.; ZHAO, C.; BURKINSHAW, B.; ZHANG, B.; WEI, D.; WANG, Y.; DONG, T. G.; SHEN, X. Manganese scavenging and oxidative stress response mediated by type VI secretion system in *Burkholderia thailandensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, 114, p. E2233-E2242, 2017.

SILVA, A. M. F.; MELO, N. F. DE; SOUZA, E. B. DE; COELHO, Â. K.; MARIANO, R. DE L. R. Limpeza clonal de mudas de videira infectadas por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 35, p.316-319, 2013.

SILVA, F. G. DA; SHEN, Y.; DARDICK, C.; BURDMAN, S.; YADAV, R. C.; LEON, A. L. DE; RONALD, P. C. Bacterial Genes Involved in Type I Secretion and Sulfation Are Required to Elicit the Rice Xa21 -Mediated Innate Immune Response. **Molecular Plant-Microbe Mnteractions: MPMI**, St. Paul, v. 17, p. 593-601, 2004.

SILVA, P. C. G.; COELHO, R. C. **Cultivo da videira. Caracterização social e econômica**. Embrapa Semiárido. Sistemas de Produção1, 2ª ed. Versão 223 Eletrônica. Agosto/2010. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/sistema_producao/spuva/Caracterizaca_social_da_%20videira.html>. Acesso em: 15 ago. 2020.

SIMPSON, A. J.; REINACH, F. C.; ARRUDA, P.; ABREU, F. A.; ACENCIO, M.; ALVARENGA, R.; ALVES, L.M.; ARAYA, J. E.; BAIA, G. S.; BAPTISTA, C. S.; BARROS, M. H.; BONACCORSI, E. D.; BORDIN, S.; BOVÉ, J.M.; BRIONES, M. R.; BUENO, M. R.; CAMARGO, A. A.; CAMARGO, L. E.; CARRARO, D. M.; CARRER, H.; COLAUTO, N. B.; COLOMBO, C.; COSTA, F. F.; COSTA, M. C.; COSTA-NETO, C. M.; COUTINHO, L. L.; CRISTOFANI, M.; DIAS-NETO, E.; DOCENA, C.; EL-DORRY, H.; FACINCANI, A. P.; FERREIRA, A. J.; FERREIRA, V. C.; FERRO, J. A.; FRAGA, J. S.; FRANÇA, S. C.; FRANCO, M. C.; FROHME, M.; FURLAN, L. R.; GARNIER, M.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H.; GOMES, S.L.; GRUBER, A.; HO, P. L.; HOHEISEL, J. D.; JUNQUEIRA, M.L.; KEMPER, E. L.; KITAJIMA, J. P.; KRIEGER, J. E.; KURAMAE, E. E.; LAIGRET, F.; LAMBAIS, M. R.; LEITE, L. C.; LEMOS, E. G.; LEMOS, M. V.; LOPES, S. A.; LOPES, C. R.; MACHADO, J. A.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A. M.; MADEIRA, H. M.; MARINO, C. L.; MARQUES, M. V.; MARTINS, E. A.; MARTINS, E. M.; MATSUKUMA, A. Y.; MENCK, C. F.; MIRACCA, E. C.; MIYAKI, C. Y.; MONTERIRO-VITORELLO, C. B.; MOON, D. H.; NAGAI, M. A.; NASCIMENTO, A. L.; NETTO, L. E.; NHANI, A. JR.; NOBREGA, F. G.; NUNES, L. R.; OLIVEIRA, M. A.; DE OLIVEIRA, M. C.; DE OLIVEIRA, R. C.; PALMIERI, D. A.; PARIS, A.; PEIXOTO, B. R.; PEREIRA, G. A.;

PEREIRA, H. A. JR.; PESQUERO, J. B.; QUAGGIO, R. B.; ROBERTO, P. G.; RODRIGUES, V.; DE ROSA, V. E. JR.; DE SÁ, R. G.; SANTELLI, R. V.; SAWASAKI, H. E.; DA SILVA, A. C.; DA SILVA, A. M.; DA SILVA, F. R.; DA SILVA, W. A. JR.; DA SILVEIRA, J. F.; SILVESTRI, M. L.; SIQUEIRA, W. J.; DE SOUZA, A. A.; DE SOUZA, A. P.; TERENCE, M. F.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; TSUHAKO, M. H.; VALLADA, H.; VAN SLUYS, M. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VETTORE, A. L.; ZAGO, M. A.; ZATZ, M.; MEIDANIS, J.; SETUBAL, J. C. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, London, v. 406, p. 151-9, 2000.

SLATER, H.; ALVAREZ-MORALES, A.; BARBER, C. E.; DANIELS, M. J.; DOW, J. M. A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*: Cell-cell signalling in *Xanthomonas campestris*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 38, p. 986-1003, 2002.

SILIPO, A.; ERBS, G.; SHINYA, T.; MAXWELL DOW, J. M.; PARRILLI, M.; LANZETTA, R.; SHIBUYA, N.; NEWMAN, M. A.; MOLINARO, A. Glycoconjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity. **Glycobiology**, Oxford, v. 20, p. 406-419, 2009.

SMITH, T. J.; SONDERMANN, H.; O'TOOLE, G. A. Type 1 Does the Two-Step: Type 1 Secretion Substrates with a Functional Periplasmic Intermediate. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 200, p. e00168-18, 2018.

SOLÉ, M.; SCHEIBNER, F.; HOFFMEISTER, A. K.; HARTMANN, N.; HAUSE, G.; ROTHER, A.; JORDAN, M.; LAUTIER, M.; ARLAT, M.; BÜTTNER, D. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* secretes proteases and xylanases via the Xps type II secretion system and outer membrane vesicles. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 197, p. 2879-2893, 2015.

SOUZA, D. P.; OKA, G. U.; ALVAREZ-MARTINEZ, C. E.; BISSON-FILHO, A. W.; DUNGER, G.; HOBEIKA, L.; CAVALCANTE, N. S.; ALEGRIA, M. C.; BARBOSA, L. R. S.; SALINAS, R. K.; GUZZO, C. R.; FARAHET, C. S. Bacterial killing via a type IV secretion system. **Nature Communications**, London, v. 6, p. 6453, 2015.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as Complex Differentiated Communities. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 56, p. 187-209, 2002.

STUDHOLME, D. J.; KEMEN, E.; MACLEAN, D.; SCHORNACK, S.; ARITUA, V.; THWAITES, R.; GRANT, M.; SMITH, J.; JONES, J. D. G. Genome-wide sequencing data reveals virulence factors implicated in banana *Xanthomonas* wilt. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 310, p. 182-192, 2010.

STUDHOLME, D. J.; WICKER, W.; ABRARE, S. M.; ASPIN, A.; BOGDANOVA, A.; BRODERS, K.; DUBROW, Z.; GRANT, M.; JONES, J. B.; KARAMURA, G.; LANG, J.; LEACH, J.; MAHUKU, G.; NAKATO, G. V.; COUTINHO, T.; SMITH, J.; BULL, C. T. Transfer of *Xanthomonas campestris* pv. *arecae* and *X. campestris* pv. *musacearum* to *X. vasicola* (Vauterin) as *X. vasicola* pv. *arecae* comb. nov. and *X. vasicola* pv. *musacearum* comb. nov. and Description of *X. vasicola* pv. *vasculorum* pv. nov. **Phytopathology**, St. Paul, v. 110, p. 1153- 1160, 2020.

SUBRAMONI, S.; PANDEY, A.; VISHNU PRIYA, M. R.; PATEL, H. K.; SONTI, R. V. The ColRS system of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is required for virulence and growth in iron-limiting conditions: The ColRS system in *Xanthomonas oryzae* virulence. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 13, p. 690-703, 2012.

SUN, Q. H.; HU, J.; HUANG, G. X.; GE, C.; FANG, R. X.; HE, C. Z. Type-II secretion pathway structural gene xpsE, xylanase- and cellulase secretion and virulence in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 54, p. 15-21, 2005.

SUN, Z.; SUN, Z.; HARRIS, H. M. B.; MCCANN, A.; GUO, C.; ARGIMON, S.; ZHANG, W.; YANG, X.; JEFFERY, I. B.; COONEY, J. C.; KAGAWA, T. F.; LIU, W.; SONG, W.; SALVETTI, E.; WROBEL, A.; RASINKANGAS, P.; PARKHILL, J.; REA, M. C.; O'SULLIVAN, O.; RITARI, J.; DOUILLARD, F. P.; ROSS, R. P.; YANG, R.; BRINER, A. E.; FELIS, J. E.; VOS, W. M.; BARRANGOU, R.; KLAENHAMMER, T. R.; CAUFIELD, P. E.; CUI, Y.; ZHANG, H.; O'TOOLE, P. W. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. **Nature Communications**, London, v. 6, p.

8322, 2015.

SUTHERLAND, I. W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. **Microbiology**, London, v. 147, p. 3-9, 2001.

SZCZESNY, R.; JORDAN, M.; SCHRAMM, C.; SCHULZ, S.; COGEZ, V.; BONAS, U.; BÜTTNER, D. Functional characterization of the Xcs and Xps type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **The New phytologist**, London, v. 187, p. 983-1002, 2010.

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. S253-54, 2004

TAMPAKAKI, A. P.; SKANDALIS, N.; GAZI, A. D.; BASTAKI, M. N.; PANAGIOTIS F., S.; CHAROVA, S. N.; KOKKINIDIS, M.; PANOPOULOS, N. J. Playing the "Harp": evolution of our understanding of hrp/hrc genes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 48, p. 347-370, 2010.

TAO, F.; SWARUP, S.; ZHANG, L.-H. Quorum sensing modulation of a putative glycosyltransferase gene cluster essential for *Xanthomonas campestris* biofilm formation: A glycosyltransferase in Xcc biofilm formation. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 12, p. 3159-3170, 2010.

TAO, J.; HE, C. Response regulator, VemR, positively regulates the virulence and adaptation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 304, n. 1, p. 20-28, 2010.

TEPER, D.; SALOMON, D.; SUNITHA, S.; KIM, J.-G.; MUDGETT, M. B.; SESSA, G. *Xanthomonas euvesicatoria* type III effector XopQ interacts with tomato and pepper 14-3-3 isoforms to suppress effector-triggered immunity. **The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology**, Oxford, v. 77, p. 297-309, 2014.

THIEME, F.; KOEBNIK, R.; BEKEL, T.; BERGER, C.; BOCH, J.; BÜTTNER, D.; CALDANA, C.; GAIGALAT, L.; GOESMANN, A.; KAY, S.; KIRCHNER, O.; LANZ, C.; LINKE, B.; MCHARDY, A. C.; MEYER, F.; MITTENHUBER, G.; NIES, D. H.; NIESBACH-KLOSGEN, U.; PATSCHKOWSKI, T.; RUCKERT, C.; RUPP, O.; SCHNEIKER, S.; SCHUSTER, S. C.; VORHOLTER, F.-J.; WEBER, E.; PUHLER, A.; BONAS, U.; BARTELS, D.; KAISER, O. Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, p. 7254-7266, 2005.

THOMAS, S.; HOLLAND, I. B.; SCHMITT, L. The Type 1 secretion pathway - The hemolysin system and beyond. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, Amsterdam, v. 1843, p. 1629-1641, 2014.

TIMILSINA, S.; PEREIRA-MARTIN, J. A.; MINSAVAGE, G. V.; IRUEGAS-BOCARD, F.; ABRAHAMIAN, P.; POTNIS, N.; KOLACZKOWSKI, B.; VALLAD, G. E.; GOSS, E. M.; JONES, J. B. Multiple recombination events drive the current genetic structure of *Xanthomonas perforans* in Florida. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 10, p. 448, 2019.

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.

TORRES, P. S.; MALAMUD, F.; RIGANO, L. A.; RUSSO, D. M.; MARANO, M. R.; CASTAGNARO, A. P.; ZORREGUIETA, A.; BOUARAB, K.; DOW, J. M.; VOJNOV, A. A. Controlled synthesis of the DSF cell-cell signal is required for biofilm formation and virulence in *Xanthomonas campestris*. **Environmental Microbiology**, Washington v. 9, p. 2101-2109, 2007.

TOSTES, G. DE O.; ARAUJO, J. S. DE P.; FARIAS, A. R. G.; FRADE, D. Â. R.; OLIVARES, F. L. Detection and cellular localization of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* in seeds of commercial "Red Globe" grapes. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, v. 39, p. 134-140, 2014.

- TRINDADE, L. C. DA; MARQUES, E.; LOPES, D. B.; FERREIRA, M. Á. DA S. V. Development of a molecular method for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, p. 16–23, 2007.
- 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, p. 46-54, 2005.
- TRUNK, K.; PELTIER, J.; LIU, Y. C.; DILL, B. D.; WALKER, L.; GOW, N. A. R.; STARK, M. J. R.; QUINN, J.; STRAHL, H.; TROST, M.; COULTHURST, S. J. The type VI secretion system deploys antifungal effectors against microbial competitors. **Nature Microbiology**, London, v. 3, p. 920-931, 2018.
- VANDROEMME, J.; COTTYN, B.; POTHIER, J. F.; PFLÜGER, V.; DUFFY, B.; MAES, M. *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae*: What's in a name? **Plant Pathology**, Oxford, v. 62, p. 11231131, 2013.
- VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 45, p. 472-489, 1995.
- VAUTERIN, L.; RADEMAKER, J.; SWINGS, J. Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, p. 677-82, 2000.
- VERNIKOS, G.; MEDINI, D.; RILEY, D. R.; TETTELIN, H. Ten years of pan-genome analyses. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 23, p. 148-154, 2015.
- VICENTE, J. G.; HOLUB, E. B. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 14, p. 2-18, 2013.
- VILLELA, J. G. A.; RITSCHER, P.; BARBOSA, M. A. G.; BACCIN, K. M. S.; ROSSATO, M.; MAIA, J. D. G.; FERREIRA, M. A. S. V. Detection of *Xanthomonas citri* pv. *viticola* on grapevine by real-time PCR and BIO-PCR using primers designed from pathogenicity and xanthomonadin gene sequences. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 155, p. 445-459, 2019.
- VITAL, T. Vitivinicultura no Nordeste do Brasil: Situação Recente e Perspectivas. **Revista Econômica do Nordeste**, Fortaleza, v. 40, p. 499-524, 2009.
- VOEGEL, T. M.; WARREN, J. G.; MATSUMOTO, A.; IGO, M. M.; KIRKPATRICK, B. C. Localization and characterization of *Xylella fastidiosa* haemagglutinin adhesins. **Microbiology**, London, v. 156, p. 2172-2179, 2010.
- VOJNOV, A. A.; ZORREGUIETA, A.; DOW, J. M.; DANIELS, M. J.; DANKERTL, M. A. Evidence for a role for the gumB and gumC gene products in the formation of xanthan from its pentasaccharide repeating unit by *Xanthomonas campestris*. **Microbiology**, London, v. 144, p. 1487-1493, 1998.
- VORHÖLTER, F. J.; SCHNEIKER, S.; GOESMANN, A.; KRAUSE, L.; BEKEL, T.; KAISER, O.; LINKE, B.; PATSCHKOWSKI, T.; RÜCKERT, C.; SCHMID, J.; SIDHU, V. K.; SIEBER, V.; TAUCH, A.; WATT, S. A. WEISSHAAR, B.; BECKER, A.; NIEHAUS, K.; PÜHLER, A. The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 134, p. 33-45, 2008.
- VORHÖLTER, F. J.; NIEHAUS, K.; PÜHLER, A. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: A cluster of 15 genes is involved in the biosynthesis of the LPS O-antigen and the LPS core. **Molecular Genetics and Genomics: MGG**, Berlin, v. 266, p. 79-95, 2001.
- WANG, L.; MAKINO, S.; SUBEDEE, A.; BOGDANOVA, A. J. Novel candidate virulence factors in rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* as revealed by mutational analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 8023-8027, 2007.

WANG, J. C.; SO, B. H.; KIM, J. H.; PARK, Y. J.; LEE, B. M.; KANG, H. W. Genome-wide identification of pathogenicity genes in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* by transposon mutagenesis. **Plant Pathology**, Oxford, v. 57, n. 6, p. 1136-1145, 2008a.

WANG, L.; RONG, W.; HE, C. Two *Xanthomonas* extracellular polygalacturonases, PghAxc and PghBxc, are regulated by type III secretion regulators HrpX and HrpG and are required for virulence. **Molecular Plant-Microbe interactions: MPMI**, St. Paul, v. 21, p. 555-563, 2008b.

WANG, L.; VINOGRADOV, E. V.; BOGDANOVA, A. J. Requirement of the Lipopolysaccharide O-Chain Biosynthesis Gene *wxocB* for Type III Secretion and Virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 195, p. 1959-1969, 2013.

WEBER, E.; OJANEN-REUHS, T.; HUGUET, E.; HAUSE, G.; ROMANTSCHUK, M.; KORHONEN, T. K.; BONAS, U.; KOEBNIK, R. The Type III-Dependent Hrp Pilus Is Required for Productive Interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* with Pepper Host Plants. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, p. 2458-2468, 2005.

WHITE, F. F.; POTNIS, N.; JONES, J. B.; KOEBNIK, R. The type III effectors of *Xanthomonas*. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 10, p. 749-766, 2009.

WOOD, D. W.; SETUBAL, J. C.; KAUL, R.; MONKS, D. E.; KITAJIMA, J. P.; OKURA, V. K.; ZHOU, Y.; CHEN, L.; WOOD, G. E.; ALMEIDA, N. F. J.; WOO, L.; CHEN, Y.; PAULSEN, I. T.; EISEN, J. A.; KARP, P. D.; BOVEE, D. S.; CHAPMAN, P.; CLENDENNING, J.; DEATHERAGE, G.; GILLET, W.; GRANT, C.; KUTYAVIN, T.; LEVY, R.; LI, M. J.; MCCLELLAND, E.; PALMIERI, A.; RAYMOND, C.; ROUSE, G.; SAENPHIMMACHAK, C.; WU, Z.; ROMERO, P.; GORDON, D.; ZHANG, S.; YOO, H.; TAO, Y.; BIDDLE, P.; JUNG, M.; KRESPAN, W.; PERRY, M.; GORDON-KAMM, B.; LIAO, L.; KIM, S.; HENDRICK, C.; ZHAO, Z. Y.; DOLAN, M.; CHUMLEY, F.; TINGEY, S. V.; TOMB, J. F.; GORDON, M. P.; OLSON, M. V.; NESTER, E. W. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. **Science**, Washington, v. 294, p. 2317-23, 2001.

WU, M.; SCOTT, A. J. Phylogenomic analysis of bacterial and archaeal sequences with AMPHORA2. **Bioinformatics**, London, v. 28, p. 1033-1034, 2012.

XU, J.; WU, M.; HE, C. Identification and functional analysis of Tdrxoo, the member of TonB-dependent receptor family proteins in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Acta Microbiol Sinica**, Beijing, v. 50, p. 155-161, 2012.

YAMAZAKI, A.; HIRATA, H.; TSUYUMU, S. HrpG regulates type II secretory proteins in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Journal of General Plant Pathology**, Okayama, v. 74, p. 138-150, 2008.


YAN, Q.; HU, X.; WANG, N. The novel virulence-related gene *nlxA* in the lipopolysaccharide cluster of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* is involved in the production of lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide, motility, biofilm formation and stress resistance. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 13, p. 923-934, 2012.

YANG, F.; TIAN, F.; SUN, L.; CHEN, H.; WU, M.; YANG, C.-H.; HE, C. A Novel Two-Component System PdeK/PdeR Regulates c-di-GMP Turnover and Virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Molecular plant-microbe interactions: MPMI**, St. Paul, v. 25, p. 1361-1369, 2012.

YANG, F.; TIAN, F.; SUN, L.; CHEN, H.; WU, M.; YANG, C.-H.; HE, C. A novel two-component system PdeK/PdeR regulates c-di-GMP turnover and virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI**, St. Paul, v. 25, p. 1361-1369, 2012.

YOON, S.-H.; HA, S.-M.; KWON, S.; LIM, J.; KIM, Y.; SEO, H.; CHUN, J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 67, p. 1613-1617, 2017.

- YOUNG, J. M.; DYE, D. W.; BRADBURY, J.F.; PANAGOPOULOS, C. G.; ROBBS, C. F. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 21, p. 153-177, 1978.
- YU, X.; LUND, S. P.; SCOTT, R. A.; GREENWALD, J. W.; RECORDS, A. H.; NETTLETON, D.; LINDOW, S. E.; GROSS, D. C.; BEATTIE, G. A. Transcriptional responses of *Pseudomonas syringae* to growth in epiphytic versus apoplastic leaf sites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 110, p. E425-E434, 2013.
- YUN, M. H.; TORRES, P. S.; OIRDI, M. E.; RIGANO, L. A.; GONZALEZ-LAMOTHE, R.; MARANO, M. R.; CASTAGNARO, A. P.; DANKERT, M. A.; BOUARAB, K.; VOJNOV, A. A. Xanthan Induces Plant Susceptibility by Suppressing Callose Deposition. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 141, p. 178-187, 2006.
- ZANINI, T. V.; ROCHA, J. M. DA. O Enoturismo no Brasil: um estudo comparativo entre as regiões vinícolas do Vale dos Vinhedos (RS) e do Vale do São Francisco (BA/PE). **Revista Turismo em Análise**, São Paulo, v. 21, p. 68-88, 2010.
- ZHANG, H.; WANG, S. Rice versus *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*: a unique pathosystem. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 16, p. 188-195, 2013.
- ZHANG, S. S.; HE, Y-Q.; XU, L-M.; CHEN, B-W.; JIANG, B-L.; LIAO, J.; CAO, J-R.; LIU, D.; HUANG, Y-Q.; LIANG, X-X.; TANG, D-J.; LU, G-T.; TANG, J-L. A putative colRXC1049-colSXC1050 two-component signal transduction system in *Xanthomonas campestris* positively regulates hrpC and hrpE operons and is involved in virulence, the hypersensitive response and tolerance to various stresses. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 159, p. 569-578, 2008.
- ZHANG, W.; RONG, C.; CHEN, C.; GAO, G. F. Type-IVC Secretion System: A Novel Subclass of Type IV Secretion System (T4SS) Common Existing in Gram-Positive Genus *Streptococcus*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, p. e46390, 2012.
- ZHAO, Y.; QIAN, G.; FAN, J.; YIN, F.; ZHOU, Y.; LIU, C.; SHEN, Q.; HU, B.; LIU, F. Identification and characterization of a novel gene, hshB, in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* co-regulated by quorum sensing and clp. **Phytopathology**, St. Paul, v. 102, p. 252-259, 2012.
- ZHOU, L.; ZHANG, L. H.; CÁMARA, M.; HE, Y. W. The DSF Family of Quorum Sensing Signals: Diversity, Biosynthesis, and Turnover. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 25, p. 293-303, 2017.
- ZHU, P.-C.; LI, Y.-M.; YANG, X.; ZOU, H.-F.; ZHU, X.-L.; NIU, X.-N.; XU, L.-H.; JIANG, W.; HUANG, S.; TANG, J.-L.; HE, Y.-Q. Type VI secretion system is not required for virulence on rice but for inter-bacterial competition in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 171, p. 64-73, 2020.
- ZHU, P.-L.; ZHAO, S.; TANG, J.-L.; FENG, J.-X. The rsmA-like gene rsmAXoo of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* regulates bacterial virulence and production of diffusible signal factor: Regulation of virulence by rsmAXoo. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 12, p. 227-237, 2011.
- ZOU, H. S.; YUAN, L.; GUO, W.; LI, Y. R.; CHE, Y. Z.; ZOU, L. F.; CHEN, G. Y. Construction of a Tn5-tagged mutant library of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* as an invaluable resource for functional genomics. **Current Microbiology**, New York, v. 62, p. 908-16, 2011.

CAPÍTULO II
Comparative Genomics of *Xanthomonas citri* pv. *viticola* strains raise doubts about the classification of pathovars in *X. citri*

Artigo a ser submetido na: **Brazilian Journal of Microbiology**

São Paulo, Brasil

Qualis CAPES: A1, Fator de Impacto: 2.428

Comparative Genomics of *Xanthomonas citri* pv. *viticola* strains raise doubts about the classification of pathovars in *X. citri*

Antonio Roberto Gomes de Farias¹, Wilson José da Silva Junior², José Bandeira do Nascimento Junior², Valdir de Queiroz Balbino², Ana Maria Benko-Iseppon², Nelson Bernardi Lima³, Marco Aurélio Siqueira da Gama¹, Elineide Barbosa de Souza^{4*}

¹ Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, 52.171.900, Brazil.

² Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, PE, 50670-901, Brazil.

³ Instituto de Patología Vegetal, Unidad de Fitopatología y Modelización Agrícola, Córdoba, CP 5119

⁴ Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, 52.171.900, Brazil.

ORCID iD

Antonio Roberto Gomes de Farias: 0000-0003-4768-1547

Valdir de Queiroz Balbino: 0000-0002-4319-3952

Ana Maria Benko-Iseppon: 0000-0002-0575-3197

Nelson Bernardi Lima: 0000-0002-6145-5119

Marco Aurélio Siqueira da Gama: 0000-0001-6153-1700

Elineide Barbosa de Souza: 0000-0003-1281-3490

*Corresponding author: Elineide Barbosa de Souza; e-mail: elineidebs@yahoo.com.br

Abstract

The genus *Xanthomonas* includes species of plant pathogenic bacteria to highly economically important crops, which includes *X. citri* pv. *viticola* causing the grapevine bacterial canker, severely reducing the yield and being considered a potential risk for worldwide viticulture. Although the great importance of this bacterium to the grape production, few genomics studies were carried out to understand the pathogen better. Herein, we did the whole genome sequence of the strain CCRMXCV117 and performed its characterization along with other genomes (strains CCRMXCV80, CFBP 7764, and LMG 965) of *X. citri* pv. *viticola* available in the NCBI. We used *in silico* taxonomic methods and pan-genome to determine the evolutionary relatedness of *X. citri* pv. *viticola* with *X. citri* pathovars. The comparative genomics of *X. citri* pv. *viticola* showed variations in the global genome organization, insertion elements sequence, secondary metabolites gene clusters, and a slight variation in functional characteristics. Also, the presence of prophages sequences probably limited to these genomes was predicted. *In silico* taxonomic classification showed an average nucleotide identity and DNA-DNA hybridization as high as 99.98% and 99.99%, between the *X. citri* pv. *viticola* strains and as low as 95.9% and 64.5%, between *X. citri* pv. *viticola* and other *X. citri* genomes. These methods associated with pan-genome analysis also allowed us to support the recent reclassification of *X. citri* pv. *viticola* and contribute to the discussion on the use of *in silico* approaches for the taxonomy of prokaryotes, showing an inconsistency in the recent proposal of classification of *X. citri* and *X. funscans* as a single species.

Keywords: functional characterization, insertion sequences, pan-genome analysis, phylogenomic, average nucleotide identity.

Introduction

The genus *Xanthomonas* includes 36 species of Gram-negative bacteria with a validly published name available at <https://www.bacterio.net/genus/xanthomonas> [1], which cause disease in several economically important crops worldwide [2]. Among these plant diseases, grapevine bacterial canker caused by *X. citri* pv. *viticola* has been considered especially important in the Northeast regions of Brazil, where it became a quarantine pest present in the states of Bahia, Ceará, and Pernambuco, and Roraima, in the North part of the country [3]. Although the grapevine bacterial canker has been consistently observed only in Brazil, India, Thailand, and Africa [4-6], *X. citri* pv. *viticola* shows high potential to become a problem in other grapevine producing areas of the world in the future [6].

Xanthomonas citri pv. *viticola* causes lesions in leaves, stems, branches, inflorescences, and fruits, and depending on the tolerance level of the grapevine variety, presence of high temperature and relative humidity, the symptoms are usually more intense [7], and grapevine production may be severely compromised (Gama et al. 2018). However, despite the grapevine bacterial canker importance for Northeast Brazil and the disease to show potential risk for worldwide viticulture, there are few genomics studies about *X. citri* pv. *viticola*, which were carried out to investigate phylogenetic relationships between species of *Xanthomonas* (Gama et al. 2018), to study the evolutionary history and genetic diversity [5], and to announce genomes [6, 8].

In the last years, comparative genomics using the average nucleotide identity (ANI) based on BLAST or MUMmer algorithms (ANiB and ANiM, respectively) [9] and *in silico* DNA-DNA hybridization (*isDDH*) [10], in addition to pan-genome analysis [11], has shown to be efficient to substitute the traditional experimental methods such as the wet lab DNA-DNA hybridization (DDH). However, *isDDH* and pan-genome analysis were not yet performed to characterize strains of *X. citri* pv. *viticola* and the applicability of these techniques for taxonomic studies of this bacterium are not yet known. Moreover, the availability of a large number of genome sequences and a broad range of *in silico* tools has increased the discussion involving the species delineation and provided an attractive opportunity to determine the differences underlying distinct organisms [17]. Thus, we did the whole genome sequence of a Brazilian strain of *X. citri* pv. *viticola* and performed a functional genomic characterization and comparative pan-genome analysis among this bacterium and *X. citri* pathovars. The comparative and functional classification of the genome

of four strains of *X. citri* pv. *viticola* showed significant changes among them. Furthermore, comparative *in silico* taxonomic approaches and pan-genome analysis using a large dataset of genomes available in the online database as *X. citri* indicated a probable division into two species.

Material and methods

Data collection, genome sequencing, and annotation

We compared four genomes of *X. citri* pv. *viticola*, three Brazilian strains, CCRMXCV117 (this study), CCRMXCV80 [8], and CFBP 7764 [5] and the Indian pathotype strain LMG 965 (IBSBF1967^{PT}) published by Midha and Patil [6]. For the strains CCRMXCV80, we used the raw reads kindly provided by the authors to improve the assembly, as described for the strain CCRMXCV17 (see below). Additionally, the whole genome sequences and annotated proteins of 183 strains assigned as *X. citri* in the NCBI, available at the NCBI RefSeq database in April 2020, were downloaded and included in the genome comparisons, covering 12 pathovars (Online Resource 1). For the comparative analysis, the assemblies were filtered using as the criteria the N50 > 20.000 and/or BUSCO (presence of conserved genes) > 90%, which is implemented in the QUAST software v. 5.0.2 [13]. The genomes that had more than one deposited sequence from the same strain that passed in the quality control were kept in the analysis for the reproducibility check.

The DNA of the strain CCRMXCV117 was extracted using the MiniPrep kit for bacterial genomic DNA extraction (Axygen Biosciences, Massachusetts, USA) following the manufacturer's recommendations, and then quantified as previously described by [14]. Standard DNA library preparation and genome sequencing were performed using the Illumina HiSeq 2500 platform at the Functional Genomics Center of the University of São Paulo. A paired-end (PE) DNA library was constructed with the Illumina Nextera XT DNA Library Prep Kit v4, and sequenced on a HiSeq Flow Cell v4, with the HiSeq SBS Kit v4 and paired-reads 100 bp (2x). Initially, reads quality was visualized by FastQC [15], trimmed by removing the adapters using FASTX-Toolkit v. 0.0.13 [16], and then filtered using Sickle v.1.33 [17]. *De novo* assembly was performed with the trimmed reads using the Unicycler software v.0.4.8 [18]. After that, the assembled contigs were checked for possible contamination using the BlobToolKit (<https://github.com/blobtoolkit/blobtools2>) [19] and the contaminated contigs removed. The

resulting contigs were finally ordered against complete genomes of the reference strain *X. citri* pv. *citri* 306 (GCF_000007165.1) [20], determined by the ANIm analysis (see below) and because it is the most studied *X. citri* genome, using Progressive MAUVE [21] and the ordered scaffolded assemblies were considered as 'draft' genomes. The assembled contigs were automatically annotated using the PROKKA software v.1.13.3 [22].

Graphic visualization and comparative genomic analysis

The graphic visualization of the draft genomes was performed by the software Mauve [21] and BRIG [23]. Average Nucleotide Identity (ANI) was calculated by applying a pyani v.0.10 Python3 module (<https://github.com/widdowquinn/pyani>) [25] obtained by whole genome alignments through Mummer (ANIm) [9]. The pairwise *is*DDH values among the whole genomes were computed using the webserver genome-to-genome distance calculator v.2.1 (<http://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php>) with BLAST+ for genome alignments [26].

Functional classification of the genomes

The Class of Genes (COG) annotation of every protein belonging to the accessory fraction was done with eggNOG-mapper server v. 5.0 with default options [27]. Furthermore, complementing the functional annotation was realized through the comparison of protein sequences against the KEGG database using BLASTKOALA [28], and Gene Ontology annotation was performed using the FunctionAnnotator platform [28], with the results visualized in the WEGO server [30]. Annotation of secondary metabolites was identified using antiSMASH [31] with default parameters. Genomic islands were predicted using IslandViewer 4 [32]. Prediction of phages were performed using the PHASTER Webtool [24]²⁴. Insertion sequences (IS) were predicted using the ISfinder [33] and ISSaga [34] databases and visualized in the ISbrowser [34].

Pan-genome analysis

Pan-genome analysis of the strains was performed using Roary v3.13.0 [36]. At this point, .gff files were used as input for Roary pan-genome analysis. For the genome downloaded from the

RefSeq/NCBI, the .gbk files were converted to .gff format, and for the genomes assembled for this study, we used the .gff files outputted by PROKKA. A cutoff of 95% identity was used. The resulting orthologous were classified as core-, softcore-, shell-, and cloud-genes according to the default configuration of the software. The core genes were automatically aligned with MAFFT v. 7.310 [37] using the *-e --mafft* parameter in Roary, creating a multi-FASTA alignment of the nucleotide sequence of all of the core genes. This file was then used as input to build a maximum-likelihood phylogenomics by IQ-TREE software (version 2.0.4) [38], in a local computer, using the automatic selection of nucleotide substitution model on ModelFinder for selection of the best fitting DNA substitution model [39]. The node support was assessed with ultrafast bootstrap [40] using 100,000 replicates. The maximum likelihood tree was visualized using FigTree v1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) [41].

Results

Genome sequencing and general features of *X. citri* pv. *viticola*

The whole genome of another Brazilian strain CCRMXCV117 of *X. citri* pv. *viticola* was sequenced, and the raw data of strain CCRMXCV80 published by Lima et al. [8] was used to improve the assembly and have a better resolution of the analysis. The *de novo* genome assembly showed 53 contigs larger than 500 bp for each genome with an N50 of 379,269 bp and 359,831 bp, resulting in the genome size of 5,324,845 and 5,202,451 bp for the strain CCRMXCV80 and CCRMXCV117, respectively. The alignment annotated resulted in 4,299 and 4,393 coding sequences (CDSs) and 55 RNAs each. The assembly statistics and annotation features of the genomes of the strains of *X. citri* pv. *viticola* used in this study are listed in Table 1.

The annotation revealed that at least 1,095, 1,093, 1,091, and 1,090 proteins were assigned to clusters of orthologous groups (COG) class for the strains CCRMXCV80, CCRMXCV117, CFBP 7764, and LMG 965, respectively, which represents around 25% of the annotated genes. The proteins were grouped into 20 COG functional categories related to cellular processes and signaling: (D) cell cycle control, cell division, chromosome partitioning, (M) cell wall/membrane/envelope biogenesis, (N) cell motility, (O) post-translational modification, protein turnover, and chaperones, (T) signal transduction mechanisms, (U) intracellular trafficking,

secretion, and vesicular transport, (V) defense mechanisms; information storage and processing: (A) RNA processing and modification; (J) translation, ribosomal structure and biogenesis, (K) transcription, (L) replication, recombination and repair; metabolism: (C) energy production and conversion, (F) nucleotide transport and metabolism, (G) carbohydrate transport and metabolism, (H) coenzyme transport and metabolism, (I) lipid transport and metabolism, (P) inorganic ion transport and metabolism, (Q) secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism; and poorly characterized: (R) general function prediction only, (S) function unknown (Fig. 1; Online Resource 2). From these categories, the most representative included: cell wall/membrane/envelope biogenesis (278), amino acid transport and metabolism (231), inorganic ion transport and metabolism (217), transcription (205), carbohydrate transport and metabolism (199), translation, ribosomal structure, and biogenesis (184), energy production and conversion (182), replication, recombination, and repair (177) and signal transduction mechanisms (158), beyond genes with essential functions for adaptation such as secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism (58), and cell motility (41) (Fig. 1; Online Resource 2).

The gene ontology (GO) annotation classified the genes into three categories: molecular functions, cellular components, and biological processes. Analysis of the GO functional terms of the proteome of *X. citri* pv. *viticola* (Fig. 2) revealed that the predicted function for genes is similar among the genomes. Molecular functions comprised genes mostly involved in the classes catalytic activity (GO:0003824), binding (GO:0005488), transporter activity (GO:0005215), transcription regulator activity (GO:0140110), and molecular transducer activity (GO:0060089). For the cellular components, most of the proteins were assigned as cell part (GO:0044464), membrane (GO:0016020), membrane part (GO:0044425), protein-containing complex (GO:0032991), organelle (GO:0043226), and organelle part (GO:0044422). For the biological processes, most of the proteins were assigned in this class, with more genes related to metabolic process (GO:0008152), cellular process (GO:0009987), localization (GO:0051179), biological regulation (GO:0065007), regulation of biological process (GO:0050789), response to stimulus (GO:0050896), signaling (GO:0023052), and cellular component organization or biogenesis (GO:0071840).

The KEGG annotation of the *X. citri* pv. *viticola* proteins showed that they are distributed in 31 pathways related to metabolism, genetic information processing, environmental information processing, cellular processes, and a small number related to eukaryotic organisms (Fig. 3 and

Online Resource 3).

The annotation of the four *X. citri* pv. *viticola* genomes concerning genes involved in secondary metabolism showed that all studied strains had six secondary biosynthetic gene clusters that are likely involved in the communication with the host and between other microorganisms. These clusters include lassopeptide, bacteriocin, two different NRPS (non-ribosomal peptide synthetases), siderophore (xanthoferrin), and arylpolyene (xanthomonadin I) (Fig. 4).

Synteny and the circular graph visualization of *X. citri* pv. *viticola*

The linear and circular overview of the arrangement of the *de novo* assemblies of the CCRMXCV117 strains and other sequenced *X. citri* pv. *viticola* is shown in Fig. 5a and 5b. The linear genomes arrangement showed a high level of collinearity between them. However, translocations and inversions in of the colinear blocks are present in the genomes. Besides, the circular map produced by BRIG showed that most of the genomic regions are highly conserved between the genomes.

The searches for phages identified regions related to prophages in the four genomes, with the *Stenotrophomonas phage Smp131* and *Enterobacteria phage HK446* predict as intact and questionable in the four genomes, and the *Escherichia phage RCS47* as incomplete only in the CCRMXCV117 and CFBP 7764 strains (Table 2). The predicted of insertion IS distribution using the ISFinder revealed the presence of seven IS, with the IS1595 ssgr IS1595 absent in the strain LMG 965, and the IS3 ssgr IS51 present only in the CFBP7764 and LMG 965 strains. Also, the IS3 ssgr IS407 was more abundant in all the genomes (Table 3).

Forty-one, 52, 53, and 35, genomic islands (GIs) were identified for the strains CCRMXCV80, CCRMXCV117, CFBP 7764, and LMG 965, respectively (Fig. 6a to 6d). Genes encoding virulence factors, pathogen-associated genes, or genes involved in antibiotic resistance-associated were not detected to be associated with any of the putative GIs. The distribution of the island is coincident in the four strains. However, differences were observed between them, with a considerable number of additional islands in the CCRMXCV117 and CFBP 7764 genomes, indicating a significant difference in the genome of these strains. The predicted GIs range in size from 4.3 to 266.9 Kb, encoding proteins related to transposases, insertions elements, secretion systems, recombination, phages, and hypothetical and uncharacterized proteins.

Comparative genomic analysis

The ANI and *isDDH* values of the representative *X. citri* strains are shown in Table 4. According to the ANI and *isDDH* values, the whole genomes of *X. citri* pv. *viticola* showed high similarity, with ANI value of 99.98% and 99.99 and *isDDH* values of 100% and 99.99 between the Brazilian strains and the Indian pathotype, respectively (Online Resource 4 and Online Resource 5). The *X. citri* pv. *viticola* genomes also showed highest ANI similarity values (above 98.62%) with *X. citri* pathovars *mangiferaeindicae*, *citri*, *punicae*, *glycines*, *bilvae*, and *malvacearum*, while ANI values lowest (95.92 to 96.31%) were observed in relation to *X. citri* pathovars *vignicola*, *aurantifolii*, *fuscans*, *phaseoli*, and *anacardii* (Table 4). Similarly, higher hybridization values (86.30% to 89.50%) were observed among *X. citri* pv. *viticola* and *X. citri* pathovars *mangiferaeindicae*, *citri*, *punicae*, *glycines*, *bilvae*, and *malvacearum*, while values lowest (64.50% to 67.50%) were observed in relation to *X. citri* pathovars *vignicola*, *aurantifolii*, *fuscans*, *phaseoli*, and *anacardii* (Table 4). In addition, the genomes of *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* strain DE0062 and *X. citri* pv. *glycines* strain 2098 showed only 19.8 and 32.8 and 88.50 and 83.82 for values of ANI and *isDDH*, correspondingly.

Pan-genome analysis

To investigate the pan-genome of *X. citri* population, we checked the quality filter using the entire dataset of 187 genomes (Online Resource 1). Due to the quality issues, four strains were removed from the dataset (*X. citri* pv. *citri* strain NCPPB 3615, *X. citri* pv. *fuscans* strain LMG 826, *X. citri* pv. *citri* strain LMG 9322, and *X. citri* pv. *fuscans* strain CFBP6994). Analysis of the core and accessory genomes revealed the presence of 17,839 genes, with 1,610 core genes (9.03% in $\geq 99\%$ of strains), 1,008 soft-core genes (5.65% in 99% - 95% of the strains), 2,495 shell genes (13.99% in 15 - 95% of the strains) and 12,726 cloud genes (71.34% in less than 15% of the strains) (Fig. 7a and Fig 7b). For each group, the level of conservation among the members of the same pathovar was unusually high. The Maximum Likelihood phylogeny built using the 1,610 single-copy genes (cMLSA) alignment of the 181 strains composing the core genome clustered the genomes into two main groups (Fig. 8). Likewise, the *isDDH* analysis, the cMLSA separated the *X. citri* genomes

into two major groups: one corresponding to *X. citri* and one matching to *X. fuscans* species. Within *X. citri*, strains were assigned to the seven described pathovars (*viticola*, *malvacearum*, *bilvae*, *punicae*, *glycines mangiferaeindicae*, and *citri*) and *X. fuscans* comprises the pathovars (*anacardii*, *aurantifolii*, *phaseoli*, *fuscans*, and *vignicola*).

Discussion

The genome sequencing and assembly of the *X. citri* pv. *viticola* strain CCRMXCV117 generated 5,279,918 bp in 53 contigs, with GC content of 64.13% and 4,336 coding sequences (Table 1), which are features analogous to other *X. citri* pv. *viticola* sequenced [5,6,8] and other *X. citri* genomes available in the NCBI database [20,41]. The genome annotation resulted and comparison with other *X. citri* pv. *viticola* genomes did not showed significant differences regarding the functional classes of GO, COG, and KEGG (Fig. 1 to Fig. 3, Online Resource 2, and Online Resource 3), indicating a functional conservation of the genomes in the strains. The genome alignment of the whole genome sequences of the strains CCRMXCV117 along with strains CCRMXCV80 [8], CFPB7764 [5], and the pathotype strain LMG 965 [6] of *X. citri* pv. *viticola* (Fig. 5a and Fig. 5b) indicated genome plasticity, which may be caused by deletion, insertion, and duplication as well as genomic rearrangements caused by horizontal gene transfer events, presence of IS elements, and prophages in the genome [43,44], which can be favored by the presence of a large number of genomic islands (Fig. 6) that also contribute to the bacterial horizontal gene transfer and consequently, have significant impact on the genome plasticity and evolution, the dissemination virulence and adaptative genes [44].

Mobile elements were predicted in the genome of *X. citri* pv. *viticola*, which one intact and a questionable prophage in all the four genomes (Table 2) and the presence of prophages and IS elements families, variable among the genomes (Table 3). In addition, an incomplete prophage was found in the strains CCRMXCV117 and CFBP 7764 as part of the mobilome of this bacterium. Prophages are vital for bacterial evolution because it carries genes that contribute to the fitness or are involved in disease development [46] and environmental adaptation [47], which may have helped *X. citri* pv. *viticola* to develop the pathogenicity and speciation to grapevines. The presence and type of prophages carry variable among the *Xanthomonas* spp., for instance, the intact prophage *Stenotrophomonas* phage *Smp131* found in all *X. citri* pv. *viticola* genomes is similar to

the prophages detected in the genomes of *X. citri* pv. *citri* (strain 306), *X. campestris* pv. *campestris* (ATCC33913), and *X. oryzae* pv. *oryzae* (KACC10331, MAFF311018, and PXO99A) [48], while the *Escherichia phage RCS47* and *Enterobacteria phage HK446* seems to be restricted to the *X. citri* pv. *viticola*.

The strains CCRMXCV117 and CFBP 7764 presented more IS elements than the strains CCRMXCV80 and LMG 965, indicating to be more prone to acquire genes via horizontal gene transfer. We also observed the presence of several insertion sequences in different numbers per strains in the *X. citri* pv. *viticola* genomes (Table 3). In *X. citri* pv. *mangiferaeindicae*, the presence of the IS element from the IS1595 family, which is also present in high number in *X. citri* pv. *viticola* genomes, probably led to the deletion of the genes of the PKS (polyketide synthases) pathway in and thus, it could be responsible for the white phenotype of its colonies [6]. In addition, probably the high sum of IS1595 to play a role in the early stages of the evolution of *X. citri* pv. *mangiferaeindicae*, enabling horizontal gene transfer between bacterial populations, generating gene interruptions, or controlling gene expression, leading to the current genotypes, with stability for the content and site of IS1595 in the genomes [49]. Thus, the presence of these IS elements might contribute to the evolutionary process of the pathovars *viticola* and *mangiferaeindicae*, given that they form specific sublineages and the variable regions and unique in the are under selection in each pathovar [6]. Also, the transcription and transposition of IS are affected by host factors [50], which may favor the occurrence of significant number of IS1595 in *X. citri* pv. *viticola*, contributing to the evolution and diversity of pathovars *viticola* and *mangiferaeindicae*. Besides the mobile elements, the acquisition of resistance mechanisms and the secondary metabolites are among the notable factors, helping to prevent defense responses of host, toxicity, fitness, and virulence control of the pathogen [51]. In the whole-genome analysis of *X. citri* pv. *viticola* were identified five gene clusters encoding for secondary metabolites, presumably responsible for the adaptability to the environment, such as in defense against stresses or the production of toxic compounds that may be important during plant-bacteria interactions. All analyzed genomes possess the secondary metabolite gene clusters lassopeptide, bacteriocin, two different NRPS, siderophore (xanthoferrin), and arylpolyene (xanthomonadin I). Except for the siderophore cluster, some differences were noted among the genomes.

Bacteriocins are responsible for increasing competition during the infection process [52], which may give considerable advantage in the evolutive process of infection and survival of *X.*

citri pv. *viticola*, favoring the early infection stages of the bacterium. In this regard, bacteriocins produced by *X. perforans* race 3 inhibited the growth of the race 1 in the greenhouse and the field experiments, favoring the race 3 in tomato fields [53]. Regarding the siderophore, Pandey et al. [54] showed that in *X. campestris* pv. *campestris*, the siderophore-mediated iron uptake may cause increased accumulation of intracellular iron, and that may affect the expression of *hrp* genes, which are induced under iron-deplete conditions, contributing to the optimum virulence and growth. Also, the lassopeptides, a potent antimicrobial peptide [55], which do not have the function are not studied in the *Xanthomonas* species, can give a considerable advantage to the *X. citri* pv. *viticola* adaptation, given their antimicrobial, antiviral, receptor antagonistic, or enzyme inhibitory activities functions [56].

Likewise, the NRPS/PKS complexes present in *X. citri* pv. *viticola* genomes (Fig. 5), also identified *X. citri* pathovars *viticola*, *citri*, *mangiferaeindicae*, and *punicae* [6] were found to have high identity values (>95%), with several other *X. citri* genomes present in the database (data not shown), indicating the importance of these elements in the *Xanthomonas* genomes. Besides, variations in the NRPS-PKS cluster can also contribute to the production of novel adaptative metabolites like in *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* [6], favoring the pathogen. As showed, all these predicted secondary metabolites gene clusters predicted in the *X. citri* pv. *viticola* genomes are known or predicted to harbor several biological activities such as adaptation to unfavorable environments or interspecific competition.

The comparative genomic assessment of the dataset based on the ANI analysis showed high variability among pathovars of *X. citri*. First, *X. citri* pv. *viticola*, the focus of this study, showed a low ANI variation. Indeed, the ANI values between the *X. citri* pv. *viticola* genomes were close to at least 99.98% (Table 4; Online Resource 4), while when comparing to the *X. citri* and *X. fuscans* genomes identity, the ANI values were ways above 98.60% and 95.92%, respectively. The division of the *X. citri* into two groups with a considerable difference in the ANI, in which the second includes *X. fuscans* species and related pathovars proposed Constantin et al. [57], indicates the real existence of two species, even though the ANI values are above the cutoff of 95-95% for delineation of species [9,58]. These results diverged from the isDDH, where the hybridization values between strains from the different groups were below the cutoff value of 70% [26]. The *X. citri* pathovars *citri*, *bilvae*, *viticola*, *glycines*, *malvacearum*, *mangiferaeindicae*, and *punicae* included the genomes with the ANI and DDH values higher than 98.60% and 86.30%,

respectively, and the *X. citri* pathovars *aracearum aurantifolii*, *anacardia*, *fuscans*, and *phaseoli* presented ANI values above the 95-96% value for species delineation cutoff, and the DDH is below the 70% cutoff. As noticed, the ANI thresholds for acceptance of species-level matches the criteria determined by Richter and Rosseló-Mora [9]. However, when using isDDH and cMLSA the results showed values below the cutoff of 70% for the species delineation and the apparent separation in two groups, respectively. This finding indicates that the analysis based only on ANI requires further investigation into the determination of the species. Ciufu et al. [59] suggested that for determination of ANI cutoff values for some species which, when grouped at 96% identity, including *X. citri* and *X. fuscans* species, do not form groups that reflect the species boundaries, to be given cutoff values which more precisely reflect their species assignments. For these authors, it is necessary to continue changing the curation efforts in consultation with the research community to make changes in these situations. However, Constantin et al. [57] showed that values of up to 69% were obtained between strains of *X. citri* and *X. fuscans*, what challenging to decide whether they necessary classification of them into two different species. Nevertheless, Ah-You et al. [60] showed that the distances derived from AFLP and MLSA between the type strains of *X. citri* and *X. fuscans*, were not enough to support the classification of *X. citri* as *X. fuscans* and, therefore, *X. fuscans* should be considered a later heterotypic synonym of *X. citri*.

Worth noting that the *in silico* comparisons do not take into account the $5^{\circ}\text{C } \Delta T_m$ [61] values, which were used by Ah-You et al. [60], combined with the close phylogenetic relationship when proposed for the first time that *X. fuscans* should be considered a synonym of *X. citri*. Also, we do not have studies showing the correlation between the ANI values and isDDH and ΔT_m values. Only a Richter and Rosseló-Móra [9] study showed that in *Vibrio* spp. group, ANIm values of around 97% resembled ΔT_m metric of 1.1 $^{\circ}\text{C}$, and the ANIm of 78% with ΔT_m of about 7.1 $^{\circ}\text{C}$, suggesting that the negative correlation of the ANIm with ΔT_m and the species delineation limit could lower than 5 $^{\circ}\text{C}$. However, this information is not enough to infer about the ANI and ΔT_m correlation and, thus, studies to solve this issue should be done.

The pan-genome analysis determined 1,610 genes comprising the core genes of the dataset used in this study (Fig. 7a). Initially, the gene presence/absence profile revealed the similarities and diversity of the genomes (Fig. 7b). It was possible to see a pathovar level clustering, demonstrating that the pathovar shares specific genes and gene clusters for host and/or environment adaptation or distinct alien genes acquired in the evolution process. We used these

core genes to infer the phylogenetic relationship of the genomes and observed that similar to the *isDDH*, the cMLSA of 1,610 single-copy genes separated the genomes into two groups (Fig. 8).

Indeed, the *in silico* ANI and DDH analysis widely used as the representative analyses to compare the overall similarity between two genomes, providing useful evidence for species delimitation among bacteria, substituting the laborious and limiting wet-lab techniques. With these approaches, associated with the cMLSA, we provided the most robust genomic classification of *X. citri* and *X. fuscans*. However, it is clear that the use of only the ANI approach sometimes may produce inconsistent results, probably due to the different sensitivity and sensibility of the method, once the *isDDH* provides higher correlations to wet-lab DDH than ANI, allowing better resolution in the species-delimitation using *in silico* approaches, with the accuracy of the traditional DDH [10,61].

The genome sequence and pan-genome analysis of *Xanthomonas citri* pv. *viticola* exposed the main genome individualities characteristics related to its genome evolution, adaptation, and bacterium survivor. We also supplied important information to a better comprehension of this plant pathogen for the subsequent studies. Besides, *in silico* genomic approaches for the taxonomy of bacteria, through ANI, DDH, and pan-genome study associated with the MLSA analysis provided essential clues to support the recent classification of *X. citri* pv. *viticola* and contributed to the discussion on the use of *in silico* approaches for the taxonomy of prokaryotes, with *X. citri sensu lato* group, showing a discordance in the recently proposed classification of *X. citri* and *X. fuscans* as a single species.

References

1. Parte AC (2018) LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *Int J Syst Evol Microbiol*. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002786>
2. Mansfield J, Genin S, Magori S, et al (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>
3. BRASIL (2018). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N° 38, de 1° de outubro de 2018, 2018. http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/43461167/do1-2018-10-02-instrucao-normativa-n-38-de-1-de-outubro-de-2018-43461024. Accessed 15 Mar 2020
4. Gama MAS, Mariano R de LR, da Silva Júnior WJ, et al (2018) Taxonomic Repositioning of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 as *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 comb. nov. and Emendation of the Description of *Xanthomonas citri* pv. *anacardii*. *Phytopathology* <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-18-0037-R>

5. Ferreira MASV, Bonneau S, Briand M, et al (2019) *Xanthomonas citri* pv. *viticola* affecting grapevine in Brazil: Emergence of a successful monomorphic pathogen. *Front Plant Sci.* <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00489>
6. Midha S, Patil PB (2014) Genomic insights into the evolutionary origin of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and its ecological relatives. *Appl Environ Microbiol.* <https://doi.org/10.1128/AEM.01654-14>
7. Araújo, JSP, Robbs, CF, Maciel, GF (1999) Incidência do cancro bacteriano da videira na estação chuvosa do Submédio São Francisco. *Fitopat. Bras.* 24(supl.):246
8. Lima NB, Gama MAS, Mariano RLR, et al (2017) Complete Genome Sequence of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* Strain CCRMXCV 80 from Brazil. *Genome Announc.* <https://doi.org/10.1128/genomeA.01263-17>
9. Richter M, Rosselló-Móra R (2009) Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci.* <https://doi.org/10.1073/pnas.0906412106>
10. Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP, Göker M (2014) Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics.* <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60>
11. Jeffroy O, Brinkmann H, Delsuc F, Philippe H (2006) Phylogenomics: the beginning of incongruence? *Trends Genet.* <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.02.003>
12. de Maayer P, Aliyu H, Vikram S, et al (2017) Phylogenomic, pan-genomic, pathogenomic and evolutionary genomic insights into the agronomically relevant enterobacteria *Pantoea ananatis* and *Pantoea stewartii*. *Front Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01755>
13. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. (2013) QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics.* <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
14. Gama MAS, Mariano RL, Viana FMP, Ferreira MA, Silveira EB (2011) Polyphasic Characterization of Pigmented Strains of *Xanthomonas* Pathogenic to Cashew Trees. *Plant Dis.* <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-10-0321>
15. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Accessed 10 Jan 2020
16. Fastx-toolkit. FASTQ/A short-reads pre-processing tools. http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/. Accessed 10 Jan 2020
17. Joshi NA, Fass JN. (2011) Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33) [Software]. <https://github.com/najoshi/sickle>. Accessed 10 Jan 2020
18. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE (2017) Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol.* <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>
19. Challis R, Richards E, Rajan J, Cochrane G, Blaxter M (2020) BlobToolKit - Interactive Quality Assessment of Genome Assemblies. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400908>
20. Da Silva ACR, Ferro JA, Reinach FC, et al (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature.* <https://doi.org/10.1038/417459a>
21. Darling ACE, Mau B, Perna NT (2010) progressiveMauve: Multiple Genome Alignment with Gene Gain, Loss and Rearrangement. Stajich JE, ed. *PLoS One.* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011147>

22. Seemann T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
23. Alikhan NF, Petty NK, Ben Zakour NL, Beatson SA (2011) BLAST Ring Image Generator (BRIG): Simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics*. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-402>
24. Arndt D, Grant JR, Marcu A, et al (2016) PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw387>
25. Pritchard L, Glover RH, Humphris S, Elphinstone JG, Toth IK (2016) Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: Soft-rotting enterobacterial plant pathogens. *Anal Methods*.
<https://doi.org/10.1039/c5ay02550h>
26. Meier-Kolthoff JP, Hahnke RL, Petersen J, et al (2014) Complete genome sequence of DSM 30083T, the type strain (U5/41T) of *Escherichia coli*, and a proposal for delineating subspecies in microbial taxonomy. *Stand Genomic Sci*. <https://doi.org/10.1186/1944-3277-9-2>
27. Huerta-Cepas J, Forslund K, Coelho LP, et al (2017) Fast genome-wide functional annotation through orthology assignment by eggNOG-mapper. *Mol Biol Evol*. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx148>
28. Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M (2016) KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1070>
29. Chen TW, Gan RC, Fang YK, et al (2017) FunctionAnnotator, a versatile and efficient web tool for non-model organism annotation. *Sci Rep*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10952-4>
30. Ye J, Fang L, Zheng H, et al (2006) WEGO: A web tool for plotting GO annotations. *Nucleic Acids Res*.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkl031>
31. Blin K, Shaw S, Steinke K, et al (2019) AntiSMASH 5.0: Updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Res*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz310>
32. Bertelli C, Laird MR, Williams KP, et al (2017) IslandViewer 4: Expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. *Nucleic Acids Res*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx343>
33. Siguier P, Filée J, Chandler M (2006) Insertion sequences in prokaryotic genomes. *Curr Opin Microbiol*.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.08.005>.
34. Kichenaradja P, Siguier P, Pérochon J, Chandler M (2010) ISbrowser: An extension of ISfinder for visualizing insertion sequences in prokaryotic genomes. *Nucleic Acids Res*.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkp947>
35. Varani AM, Siguier P, Gourbeyre E, Charneau V, Chandler M (2011) ISSaga is an ensemble of web-based methods for high throughput identification and semi-automatic annotation of insertion sequences in prokaryotic genomes. *Genome Biol*. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-3-r30>
36. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, et al (2015) Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>
37. Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
38. Nguyen LT, Schmidt HA, Von Haeseler A, Minh BQ (2015) IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol*.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>

39. Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, Von Haeseler A, Jermiin LS (2017) ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat Methods*. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
40. Minh BQ, Nguyen MAT, Von Haeseler A (2013) Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Mol Biol Evol*. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst024>
41. Rambaut A, Drummond AJ (2012) FigTree version 1.4. 0. <https://github.com/rambaut/figtree>. Accessed 12 Feb 2020
42. Gordon JL, Lefeuvre P, Escalon A, et al (2015) Comparative genomics of 43 strains of *Xanthomonas citri* pv. *citri* reveals the evolutionary events giving rise to pathotypes with different host ranges. *BMC Genomics*. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2310-x>
43. Artier J, da Silva Zandonadi F, de Souza Carvalho FM, et al (2017) Comparative proteomic analysis of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* periplasmic proteins reveals changes in cellular envelope metabolism during in vitro pathogenicity induction. *Mol Plant Pathol*. <https://doi.org/10.1111/mpp.12507>
44. Juhas M, Van Der Meer JR, Gaillard M, Harding RM, Hood DW, Crook DW (2009). Genomic islands: Tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol Rev*. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00136.x>
45. Varani AM, Monteiro-Vitorello CB, Nakaya HI, Van Sluys M-A (2013) The Role of Prophage in Plant-Pathogenic Bacteria. *Annu Rev Phytopathol*. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-173010>
46. Casas S, Maloy PH (2018) The Role of Phage in the Adaptation of Bacteria to New Environmental Niches. In: Rampelotto PH (ed) *Molecular Mechanisms of Microbial Evolution, Grand Challenges in Biology and Biotechnology*, Springer International Publishing AG, Cham, pp 267-306
47. Chae JC, Hung NB, Yu SM, Lee HK, Lee YH (2014) Diversity of bacteriophages infecting *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in paddy fields and its potential to control bacterial leaf blight of rice. *J Microbiol Biotechnol*. <https://doi.org/10.4014/jmb.1402.02013>
48. Pruvost O, Vernière C, Vital K, et al (2011) Insertion sequence- and tandem repeat-based genotyping techniques for *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae*. *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/PHTO-11-10-0304>
49. Vandecraen J, Chandler M, Aertsen A, Van Houdt R (2017) The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. *Crit Rev Microbiol*. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1303661>
50. Diversity P, Bansal K, Midha S, Kumar S, Patil PB (2017) Ecological and Evolutionary Insights into *Xanthomonas citri* Pathovar Diversity. <https://doi.org/10.1128/AEM.02993-16CE>
51. Holtsmark I, Eijsink VGH, Brurberg MB (2008) Bacteriocins from plant pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Lett*. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.01010.x>
52. Hert AP, Roberts PD, Momol MT, Minsavage G V., Tudor-Nelson SM, Jones JB (2005) Relative importance of bacteriocin-like genes in antagonism of *Xanthomonas perforans* tomato race 3 to *Xanthomonas euvesicatoria* tomato race 1 strains. *Appl Environ Microbiol*. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3581-3588.2005>
53. Pandey SS, Patnana PK, Padhi Y, Chatterjee S (2018) Low-iron conditions induces the hypersensitive reaction and pathogenicity hrp genes expression in *Xanthomonas* and is involved in modulation of hypersensitive response and virulence. *Environ Microbiol Rep*. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12650>

54. Weber W, Fischli W, Hochuli E, Kupfer E, Weibel EK (1991) Anantin - a peptide antagonist of the atrial natriuretic factor (anf): I. producing organism, fermentation, isolation and biological activity. *J Antibiot.* <https://doi.org/10.7164/antibiotics.44.164>
55. Maksimov MO, Pan SJ, James Link A (2012) Lasso peptides: Structure, function, biosynthesis, and engineering. *Nat Prod Rep.* <https://doi.org/10.1039/c2np20070h>
56. Constantin EC, Cleenwerck I, Maes M, et al (2016) Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. *Plant Pathol.* <https://doi.org/10.1111/ppa.12461>
57. Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM (2007) DNA – DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.64483-0>
58. Ciufu S, Kannan S, Sharma S, et al (2018) Using average nucleotide identity to improve taxonomic assignments in prokaryotic genomes at the NCBI. *Int J Syst Evol Microbiol.* <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002809>
59. Ah-You N, Gagnevin L, Grimont PAD, et al (2009) Polyphasic characterization of xanthomonads pathogenic to members of the Anacardiaceae and their relatedness to species of *Xanthomonas*. *Int J Syst Evol Microbiol.* <https://doi.org/10.1099/ijms.0.65453-0>
60. Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, et al (1987) International Committee on Systematic Bacteriology: Announcement of the Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Int J Syst Bacteriol.* [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(88\)80020-1](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(88)80020-1)
61. Meier-Kolthoff JP, Göker M (2019). TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nat Commun.* <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10210-3>

Tables

Table 1 General features of the *Xanthomonas citri* pv. *viticola* genomes

Feature	CCRMXCV11	CCRMXCV80	CFBP	IBSBF1967^{PT}
	7^a	b	7764^c	d
N° contigs	42	44	76	50
Size (pb)	5,279,918	5,202,451	5,311,793	5,038,669
GC content (%)	64.13	64.25	64.32	64.46
N50 ^e	359,831	379,269	592,828	306,265
Complete/Partial (%) ^f	BUSCO 95.27	95.27	95.27	95.27
N° of coding sequences (CDS)	4,393	4,299	4,442	4,431
N° of tRNA-coding genes	57	57	52	48

^a Sequenced in this study; ^b Sequenced by Lima et al. [8]; ^c Sequenced by Ferreira et al. [5]; ^d Pathotype strain, sequenced by Midha and Patil [6]. ^eBasic statistic for describing the contiguity of a genome assembly: sequence length of the shortest contig at 50% of the total genome length. ^fpercentage of genes found in the assembly entirely (or partially) using BUSCO [27].

Table 2 Prophages predicted in the four *Xanthomonas citri* pv. *viticola* genomes used in this study

Strain	Region	Length (Kb)	Completeness	#CDS	Most common phage	GC (%)
CCRMXCV80	1	11.2	questionable	8	Enterobacteria phage HK446 (GCF_000902055.1)	54.9
	2	21	intact	27	Stenotrophomonas phage Smp131 (GCF_000917355.1)	63
CCRMXCV117	1	11.2	questionable	8	Enterobacteria phage HK446 (GCF_000902055.1)	54.9
	2	21K	intact	27	Stenotrophomonas phage Smp131 (GCF_000917355.1)	63
	3	18.1	incomplete	25	Escherichia phage RCS47 (GCF_003146805.1)	59.2
CFBP 7764	1	11.2	questionable	10	Enterobacteria phage HK446 (GCF_000902055.1)	54.61
	2	21.1	intact	27	Stenotrophomonas phage Smp131 (GCF_000917355.1)	63.36
	3	18.1	incomplete	24	Escherichia phage RCS47 (GCF_003146805.1)	59.25
LMG 965	1	11.2	questionable	9	Enterobacteria phage HK446 (GCF_000902055.1)	54.62
	2	21	intact	27	Stenotrophomonas phage Smp131 (GCF_000917355.1)	63.37

Table 3 The insertion sequence predicted in the four *Xanthomonas citri* pv. *viticola* genomes using the ISfinder database

Strain	Contig	Fist hit ^a	Identified IS Family	Position ^b	ORF Size (bp)	ORF Size (aa)	Strand
CCRMXCV117	4	76.58%/ISPa43	Tn3	225,274-222,266	3,009	1,002	-
	4	50%/ISAzca1	IS1595 ssgr ISNha5	230,683-231,798	1,116	371	+
	5	79.22%/ISXac4	IS3 ssgr IS407	58,219-57,605	615	204	-
	5	98.83%/ISXac4	IS3 ssgr IS407	58,610-58,332	279	92	-
	13	63.49%/IS1051	IS5 ssgr IS5	29,364-29,555	192	63	+
	17	85.71%/ISXca4	IS1595 ssgr IS1595	360,475-360,684	210	69	+
	17	73.76%/ISBcen15	IS3 ssgr IS407	509,927-510,598	672	223	+
	19	51.62%/ISSm4	ISL3	164,120-165,400	1,281	426	+
	19	42.45%/ISSm4	ISL3	167,572-169,188	1,617	538	+
	23	98.73%/ISXca2	IS3 ssgr IS407	222,474-222,950	477	158	+
	24	68.25%/ISH7A	ISNCY	146,558-146,358	201	66	-

Table 3 Continued.

Strain	Contig	Fist hit ^a	Identified IS Family	Position ^b	ORF Size (bp)	ORF Size (aa)	Strand
CCRMXCV80	1	51.62%/ISSm4	ISL3	164,126-165,406	1,281	426	+
	1	42.45%/ISSm4	ISL3	167578-169194	1,617	538	+
	1	85.71%/ISXca4	IS1595 ssgr IS1595	986,392-986,601	210	69	+
	1	73.76%/ISBcen15	IS3 ssgr IS407	1,135,829-1,136,500	672	223	+
	9	77.32%/ISPa43	Tn3	15,277-18,270	2,994	997	+
	9	98.73%/ISXca2	IS3 ssgr IS407	240,841-241,317	477	158	+
	12	63.49%/IS1051	IS5 ssgr IS5	29,364-29,555	192	63	+
	13	76.58%/ISPa43	Tn3	225,292-222,284	3,009	1,002	-
	13	50%/ISAzca1	IS1595 ssgr ISNha5	230,701-231,816	1,116	371	+
	18	79.22%/ISXac4	IS3 ssgr IS407	58,219-57,605	615	204	-
	18	98.83%/ISXac4	IS3 ssgr IS407	58,610-58,332	279	92	-
	20	68.25%/ISH7A	ISNCY	146,558-146,358	201	66	-

Table 3 Continued.

Strain	Contig	Fist hit ^a	Identified IS Family	Position ^b	ORF Size (bp)	ORF Size (aa)	Strand
CFBP 7764	1	85.71%/ISXca4	IS1595 ssgr IS1595	227,876-228,085	210	69	+
	1	73.76%/ISBcen15	IS3 ssgr IS407	373,673-374,344	672	223	+
	2	68.25%/ISH7A	ISNCY	146,560-146,360	201	66	-
	5	63.49%/IS1051	IS5 ssgr IS5	29,414-29,605	192	63	+
	7	44.73%/ISNpu13	Tn3	455,369-456,403	1,035	344	+
	7	98.73%/ISXca2	IS3 ssgr IS407	654,180-654,656	477	158	+
	11	79.22%/ISXac4	IS3 ssgr IS407	58,269-57,655	615	204	-
	11	98.83%/ISXac4	IS3 ssgr IS407	58,660-58,382	279	92	-
	21	44.65%/ISShvi3	IS91	1,568-624	945	314	-
	24	49.75%/TnShfr1	Tn3	11561-10944	618	205	-
	25	87.25%/IS868	IS3 ssgr IS51	4,542-4,117	426	141	-
	27	76.58%/ISPa43	Tn3	225,338-222,330	3,009	1,002	-
	27	50%/ISAzca1	IS1595 ssgr ISNha5	230,747-231,862	1,116	371	+
	31	51.62%/ISSm4	ISL3	164,153-165,433	1,281	426	+
	31	42.45%/ISSm4	ISL3	167,605-169,221	1,617	538	+
	34	92.18%/TnXo19	Tn3	249,346-248,939	408	135	-

Table 3 Continued.

Strain	Contig	Fist hit ^a	Identified IS Family	Position ^b	ORF Size (bp)	ORF Size (aa)	Strand
LMG965	8	51.62%/ISSm4	ISL3	29,602-30,882	1,281	426	+
	8	42.45%/ISSm4	ISL3	33,054-34,670	1,617	538	+
	11	68.25%/ISH7A	ISNCY	146,515-146,315	201	66	-
	17	79.22%/ISXac4	IS3 sgr IS407	58,224-57,610	615	204	-
	17	98.83%/ISXac4	IS3 sgr IS407	58,615-58,337	279	92	-
	21	76.58%/ISPa43	Tn3	225,278-22,2270	3,009	1,002	-
	21	50%/ISAzca1	IS1595 sgr ISNha5	230,694-231,809	1,116	371	+
	22	85.18%/ISRtr2	IS3 sgr IS51	145,679-145,230	450	149	-
	27	98.73%/ISXca2	IS3 sgr IS407	534,737-535,213	477	158	+
	28	70.68%/TnShfr1	Tn3	214,556-215,521	966	321	+
	28	73.76%/ISBcen15	IS3 sgr IS407	217,284-217,955	672	223	+
	29	63.49%/IS1051	IS5 sgr IS5	30,359-30,550	192	63	+

^a % of similarity AAs/First hit in the ISfinder database; ^b Position in the contig.

Table 4 ANI similarities of the *Xanthomonas citri* pv. *viticola* genomes with selected genomes of *X. citri*. The similarity groups are highlighted in different colors.

Organism Name	ANI				isDDH			
	1	2	3	4	1	2	3	4
1. <i>X. citri</i> pv. <i>viticola</i> CCRMXCV80	100	99.99	99.99	99.98	100	100	100	99.9
2. <i>X. citri</i> pv. <i>viticola</i> CCRMXCV117	99.99	100	99.99	99.98	100	100	100	99.9
3. <i>X. citri</i> pv. <i>viticola</i> CFBP 7764	99.99	99.99	100	99.98	100	100	100	99.9
4. <i>X. citri</i> pv. <i>viticola</i> LMG 965 ^{PT}	99.98	99.98	99.98	100	99.9	99.9	99.9	100
<i>X. citri</i> pv. <i>citri</i> LMG9322 ^T	98.82	98.82	98.82	98.82	88.2	88.2	88.1	88.2
<i>X. citri</i> pv. <i>citri</i> 306	98.81	98.81	98.81	98.81	88.1	88.1	88	88.1
<i>X. citri</i> pv. <i>citri</i> Xcc29-1	98.81	98.81	98.81	98.81	88.1	88	88	88.1
<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i> Aw12879	98.82	98.80	98.81	98.82	87.9	87.9	87.8	87.9
<i>X. citri</i> pv. <i>malvacearum</i> XcmN1003	98.71	98.70	98.70	98.71	86.8	86.8	86.8	86.8
<i>X. citri</i> pv. <i>malvacearum</i> GSPB2388	98.69	98.69	98.69	98.70	87.1	87.1	87.1	87.2
<i>X. citri</i> pv. <i>malvacearum</i> MSCT	98.63	98.62	98.63	98.63	86.3	86.3	86.3	86.4
<i>X. citri</i> pv. <i>malvacearum</i> AR81009	98.71	98.71	98.71	98.71	86.9	86.8	86.8	86.8
<i>X. citri</i> pv. <i>bilvae</i> NCPPB 3213	98.76	98.75	98.76	98.77	88.5	88.5	88.5	88.5
<i>X. citri</i> pv. <i>glycines</i> 8ra	98.78	98.78	98.77	98.79	88.2	88.2	88.2	88.2
<i>X. citri</i> pv. <i>glycines</i> 12-2	98.75	98.75	98.74	98.76	87.9	87.9	87.9	87.9
<i>X. citri</i> pv. <i>glycines</i> CFBP 7119	98.76	98.75	98.75	98.77	87.7	87.7	87.7	87.7
<i>X. citri</i> pv. <i>punicae</i> LMG 859	98.80	98.79	98.80	98.80	88.5	88.5	88.4	88.5
<i>X. citri</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> LG56-10	98.84	98.84	98.85	98.85	88.6	88.6	88.6	88.6
<i>X. citri</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> LMG 941	98.89	98.89	98.88	98.89	89.5	89.4	89.4	89.5

Table 4 Continued.

Organism Name	ANI				isDDH			
	1	2	3	4	1	2	3	4
<i>X. citri</i> pv. <i>anacardii</i> IBSBF2579	96.30	96.31	96.23	96.24	66.6	66.6	66.6	66.6
<i>X. citri</i> pv. <i>anacardii</i> TAQ18	96.29	96.29	96.22	96.23	66.8	66.7	66.7	66.7
<i>X. citri</i> pv. <i>anacardii</i> TAQ13	96.29	96.29	96.22	96.23	66.7	66.7	66.6	66.6
<i>X. citri</i> pv. <i>fuscans</i> Xff49	96.27	96.27	96.26	96.26	67.2	67.1	67.1	67.1
<i>X. citri</i> pv. <i>fuscans</i> CFBP6960	96.25	96.24	96.24	96.24	66.9	66.9	66.9	66.9
<i>X. citri</i> pv. <i>fuscans</i> NCPPB 381 ^T	96.25	96.24	96.24	96.24	67.2	67.2	67.1	67.1
<i>X. citri</i> pv. <i>aurantifolii</i> FDC 1561	96.30	96.30	96.29	96.29	67.3	67.3	67.3	67.3
<i>X. citri</i> pv. <i>aurantifolii</i> FDC 1559	96.29	96.30	96.29	96.30	67.3	67.2	67.5	67.3
<i>X. citri</i> pv. <i>aurantifolii</i> FDC 535	96.28	96.28	96.28	96.29	67.1	67.1	67.2	67.1
<i>X. citri</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i> CFBP6988R	96.27	96.27	96.26	96.26	66.9	66.9	66.9	66.9
<i>X. citri</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i> CFBP6996R	96.29	96.29	96.28	96.29	66.8	66.8	66.8	66.8
<i>X. citri</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i> CFBP6994R	96.29	96.28	96.28	96.28	66.7	66.7	66.7	66.7
<i>X. citri</i> pv. <i>vignicola</i> CFBP7113	96.31	96.31	96.30	96.30	67.3	67.3	67.3	67.3
<i>X. citri</i> pv. <i>aracearum</i> LMG 7399	95.92	95.92	95.92	95.92	64.5	64.6	64.5	64.5
<i>X. citri</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> DE0062	83.82	83.82	83.83	83.82	19.8	19.8	19.8	19.8
<i>X. citri</i> pv. <i>glycines</i> 2098	88.50	88.50	88.50	88.50	32.8	32.8	32.8	32.8

Figures

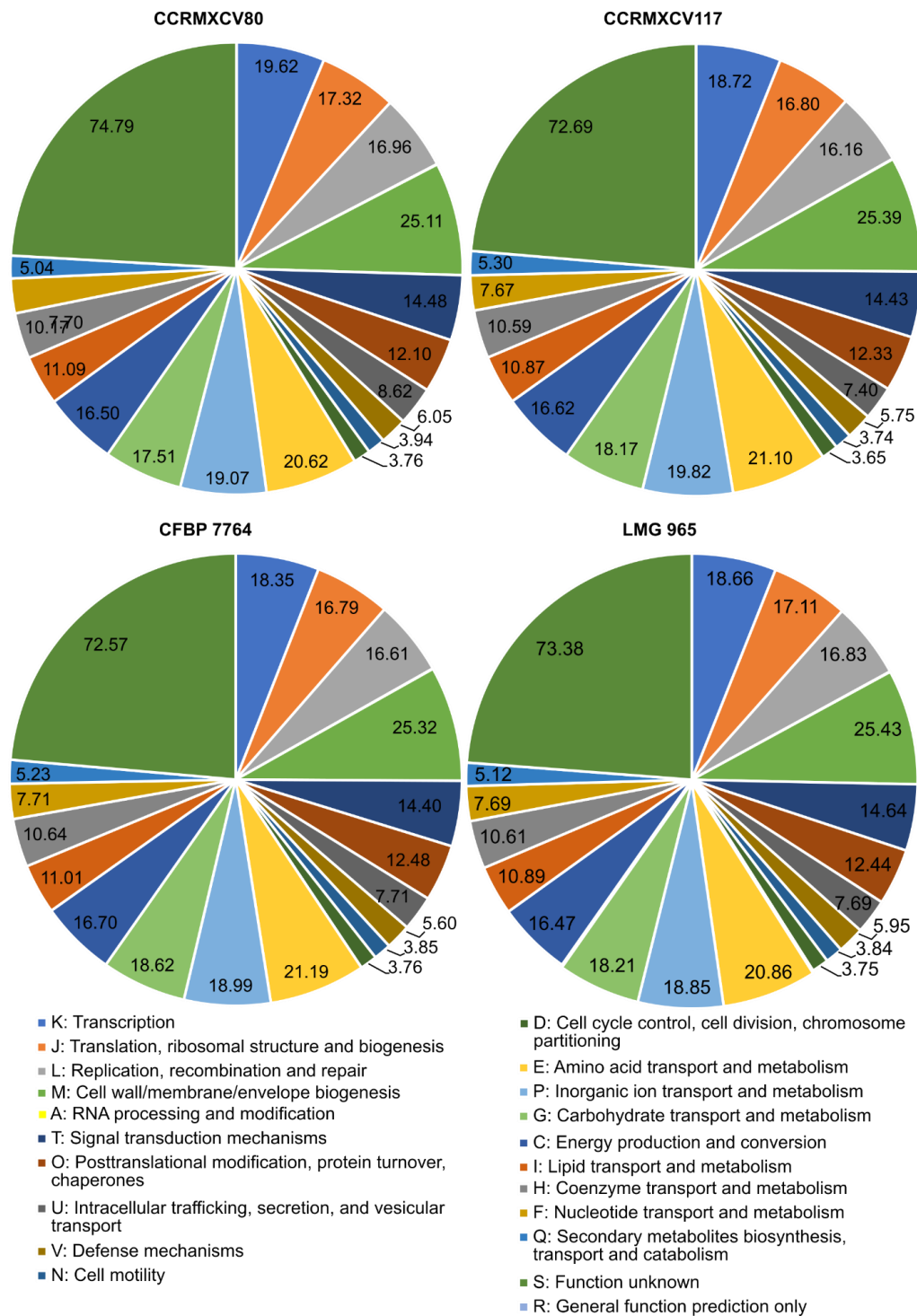


Fig. 1 Distribution of functional categories of clusters of orthologous groups (COG) for the genomes of the strains CCRMXCV80, CCRMXCV117, CFBP 7764, and LMG 965 of *Xanthomonas citri* pv. *viticola*.

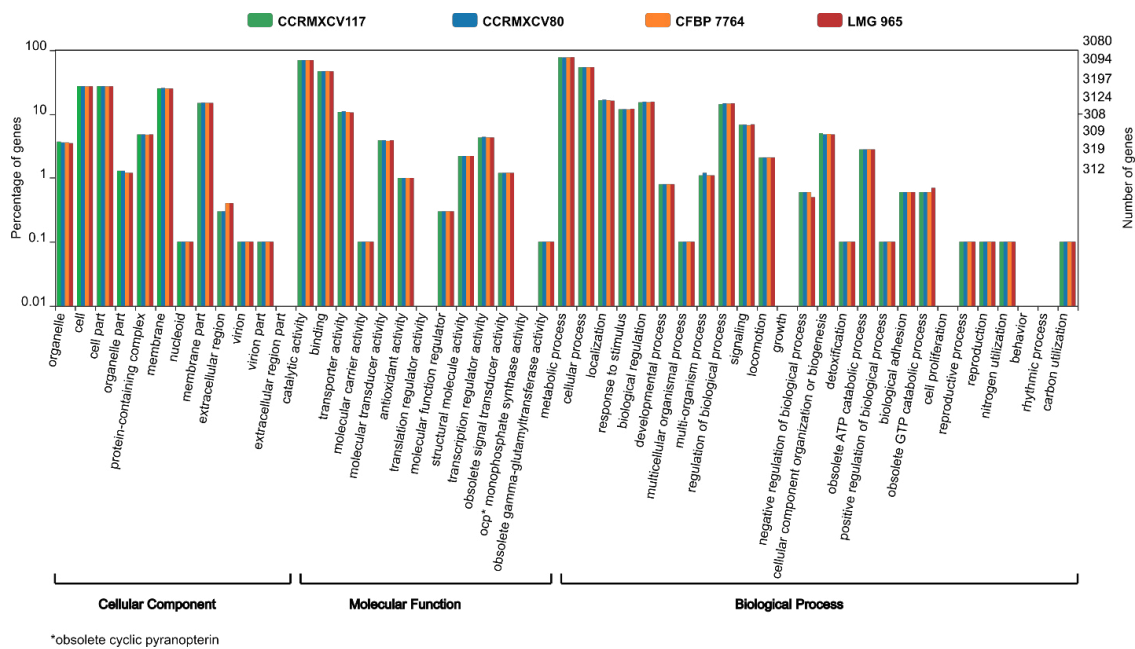


Fig. 2 Gene ontology (GO) classification of the proteome for the strains CCRMXCV80, CCRMXCV117, CFBP 7764, and LMG 965 of *Xanthomonas citri* pv. *viticola*. Bar graph was generated by the BGI WEGO online software (<http://wego.genomics.org.cn/>) (Ye et al. 2018). Genes were clustered into three main GO categories: cellular component, molecular function, and biological process. The right Y-axis refers to the number of genes in a specific category, and the left Y-axis represents the percentual in a specific category. In some cases, one gene could be assigned with more than one GO term.

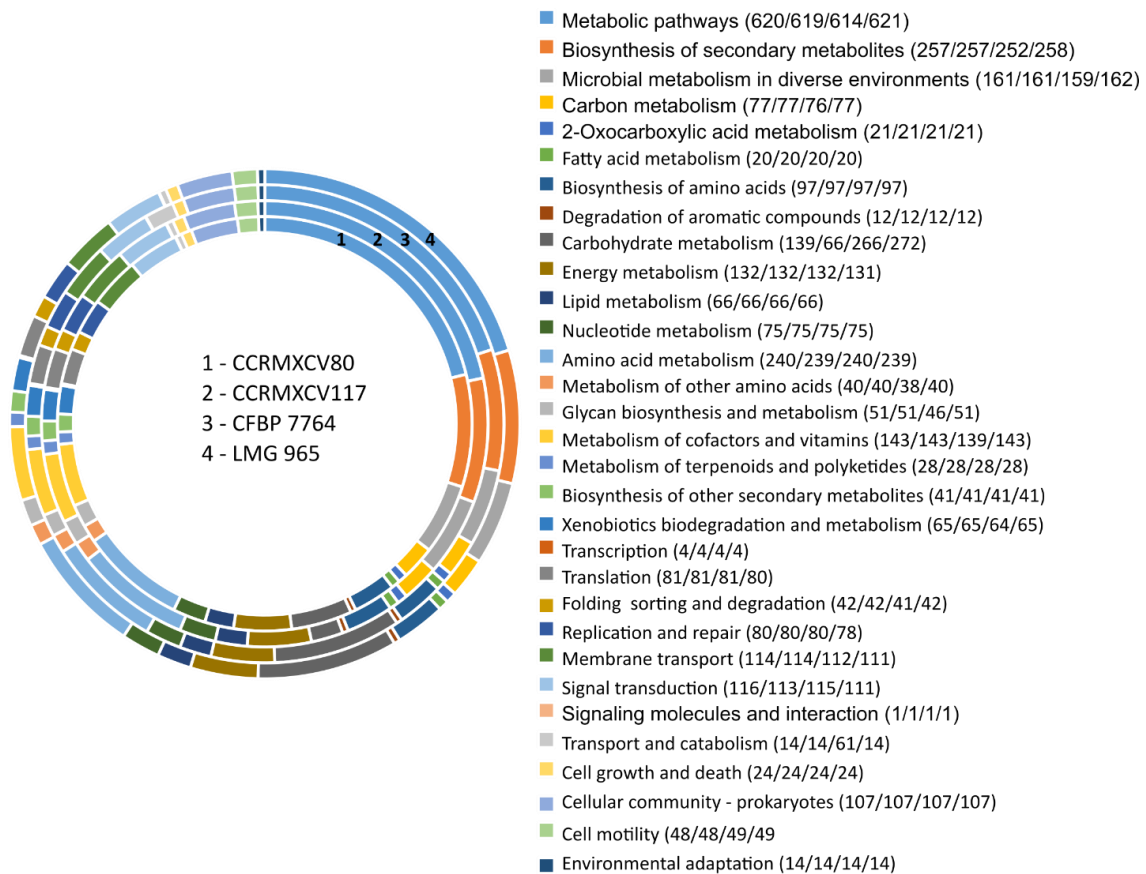


Fig. 3 Function classification for the genomes of the strains CCRMXCV80, CCRMXCV117, CFBP 7764, and LMG 965 of *Xanthomonas citri* pv. *viticola*. The proteins were divided into five branches according to the KEGG database for metabolic pathway cellular processes, environmental information processes, genetic information processes, metabolism, and organismal systems, and after in the subcategories showed in this figure and Online Resource 3.

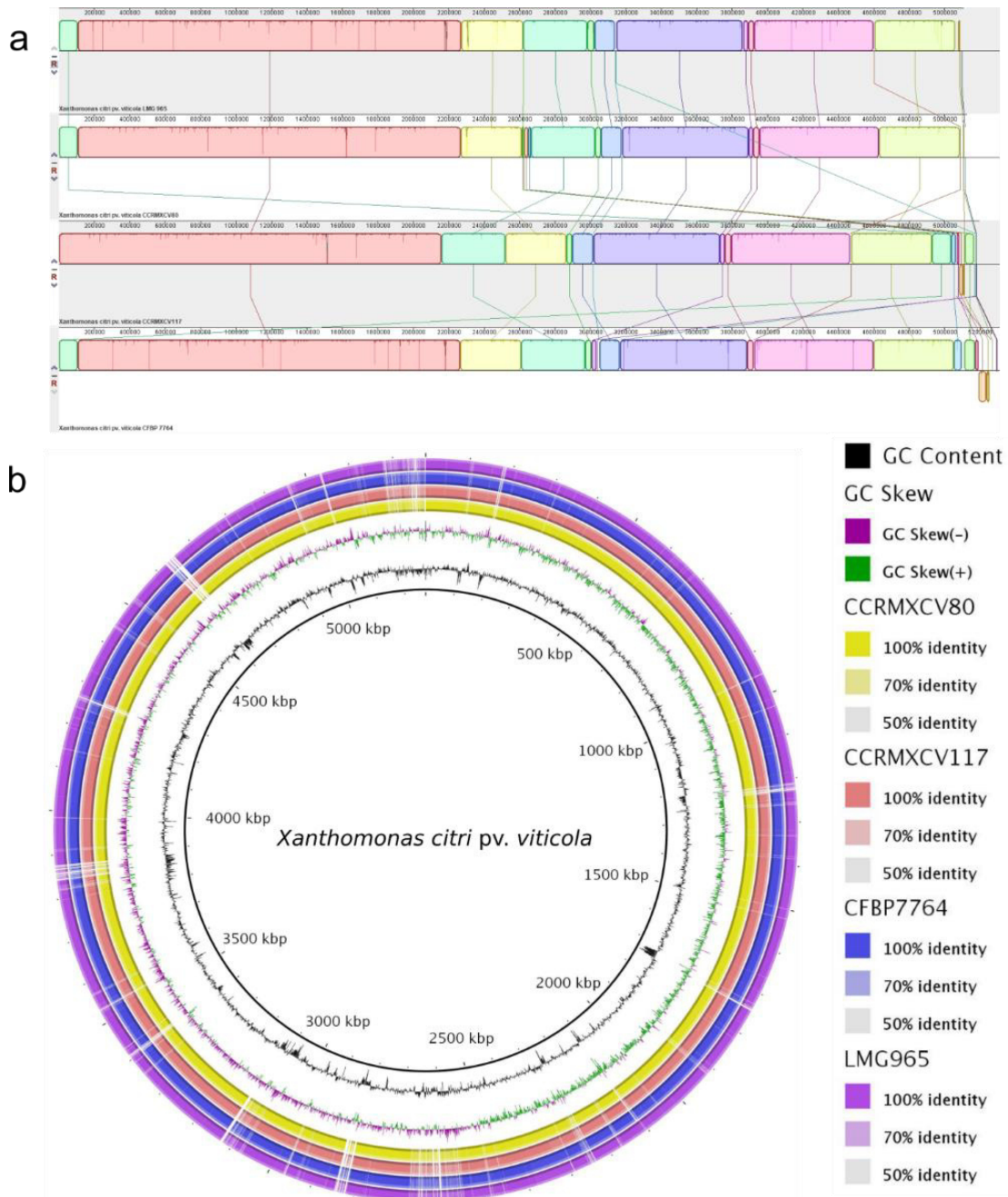


Fig. 5 Linear and circular overview for the genomes of the strains CCRMXC80, CCRMXCV117, CFBP 7764, and LMG 965 of *Xanthomonas citri* pv. *viticola*. a - Linear visualization of the MAUVE alignment. The colored blocks represent collinear sequence blocks shared by all strains. Blocks below the horizontal line indicate sequences found in a contrary orientation; b - Circular representation built with BRIG. In the internal circles from inner to outer represent the genome size, GC skew (green represents a region with G content higher than C, purple represents a region with C content greater than G), GC ratio (black, outward means GC ratio of the region is higher than average GC ratio; black, inward means GC ratio of the region is lower than average GC ratio). Variation in intensity of each color correlates with the approximate identity between them and *X. citri* subsp. *citri* 306 genome used as a reference.

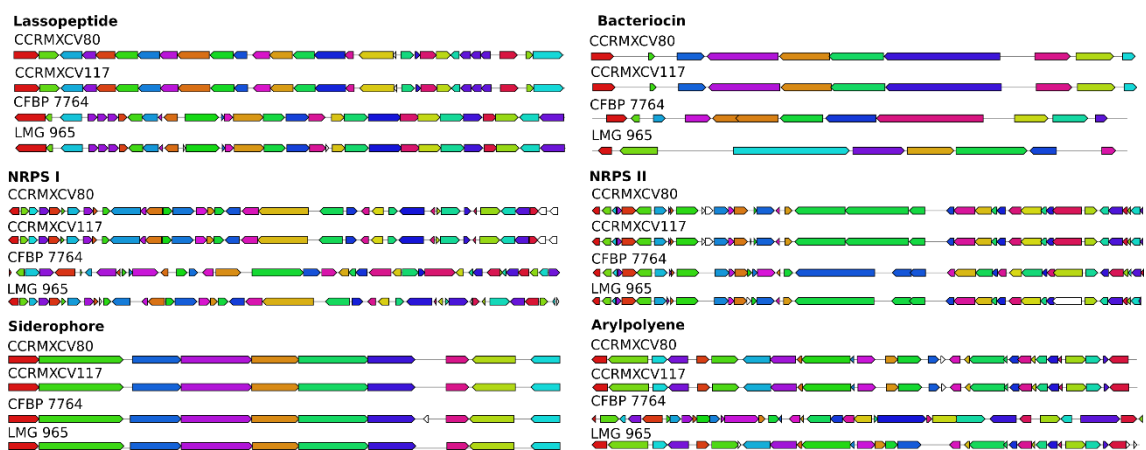


Fig 4 Secondary metabolite gene clusters predicted for the genomes of the strains CCRMXCV80, CCRMXCV117, CFBP 7764, and LMG 965 of *Xanthomonas citri* pv. *viticola*. Each color of a gene represents a different class secondary metabolite.

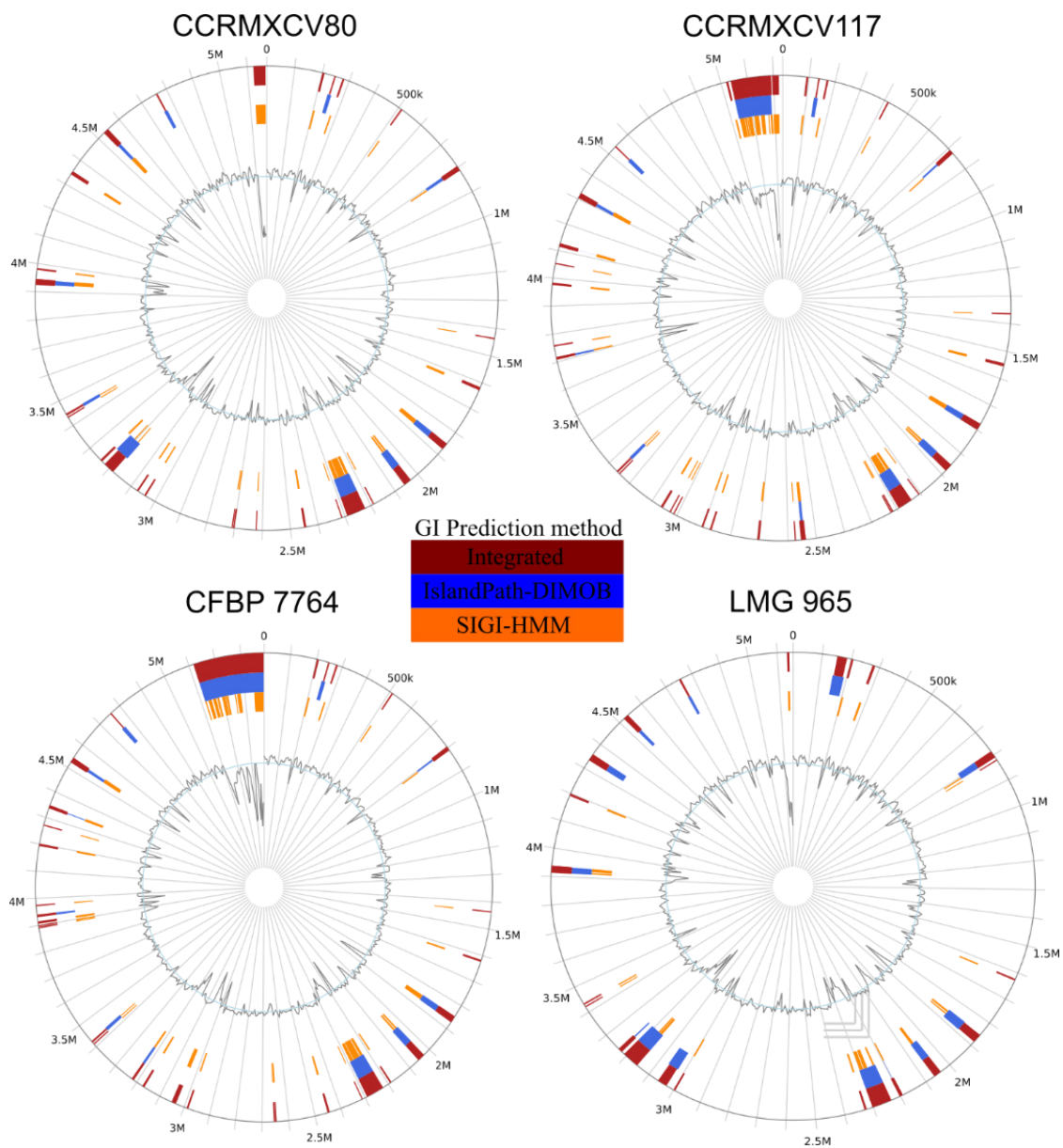


Fig. 6 Genomic islands for the genomes of the strains CCRMXCV80, CCRMXCV117, CFBP 7764, and LMG 965 of *Xanthomonas citri* pv. *viticola* predicted by using IslandViewer 4. The different colors represent the island predicted by the methods IslandPath-DIMOB, SIGI-HMM, or at least one of them.

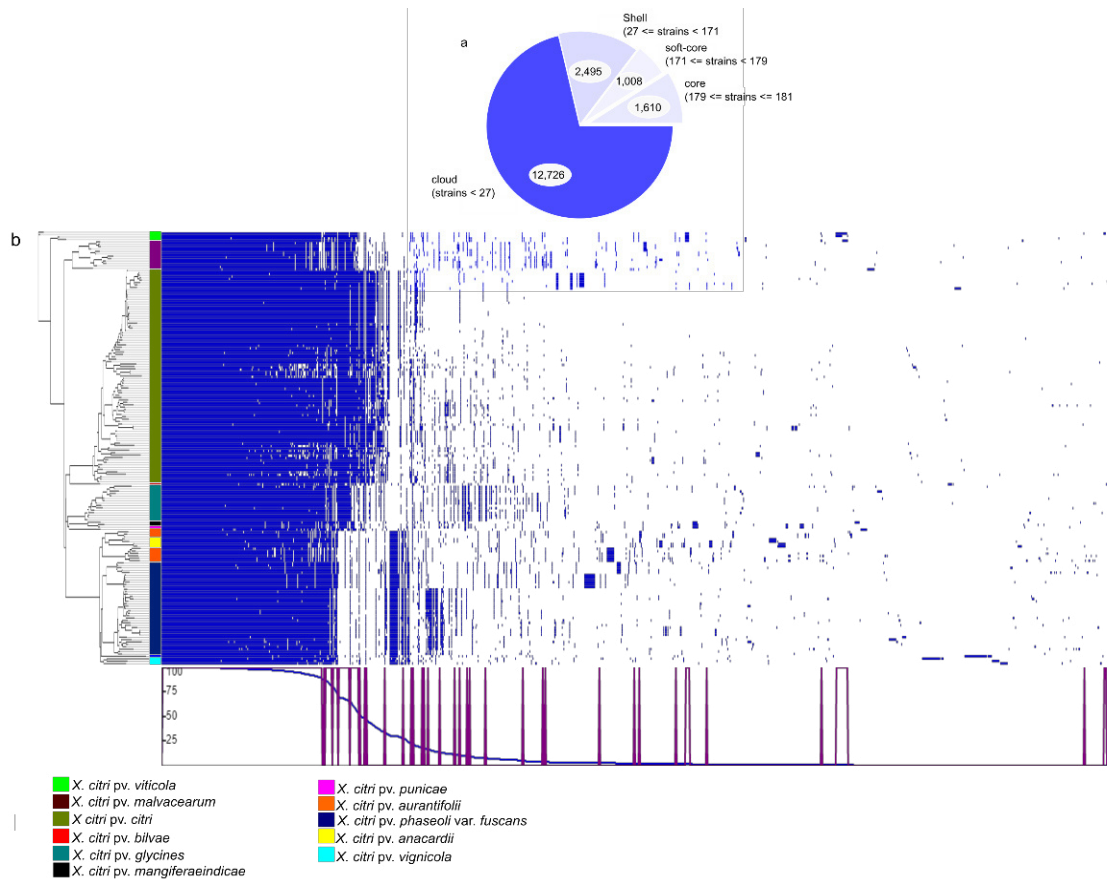


Fig. 7 The pan-genome shape of *Xanthomonas citri* genomes generated by Roary software. **a** - Pan-genome similarity matrix chart representation regarding conserved genes vs. total genes in 183 genomes of *Xanthomonas* spp. The left side, unrooted maximum likelihood tree based on core and accessory presence/absence genes in the genomes. The right side Right, pan-genome distribution of the pan-genome genes based on the core and accessory genes showing phylogenetic relatedness of the strains by blue (present) and white (absent). Bottom, representation of the number of genomes alongside the gene matrix; purple highlight indicates the distribution of the genes in the *X. citri* pv. *viticola* strains CCRMXCV117 genome. The results clearly indicate great clade-specific gene content. The colored bar indicates the specific pathotype among the *X. citri* genomes. **B** - The pan-genome pie-chart shows the different gene categories (core, soft-core, shell, and cloud) present in the genome sequences.

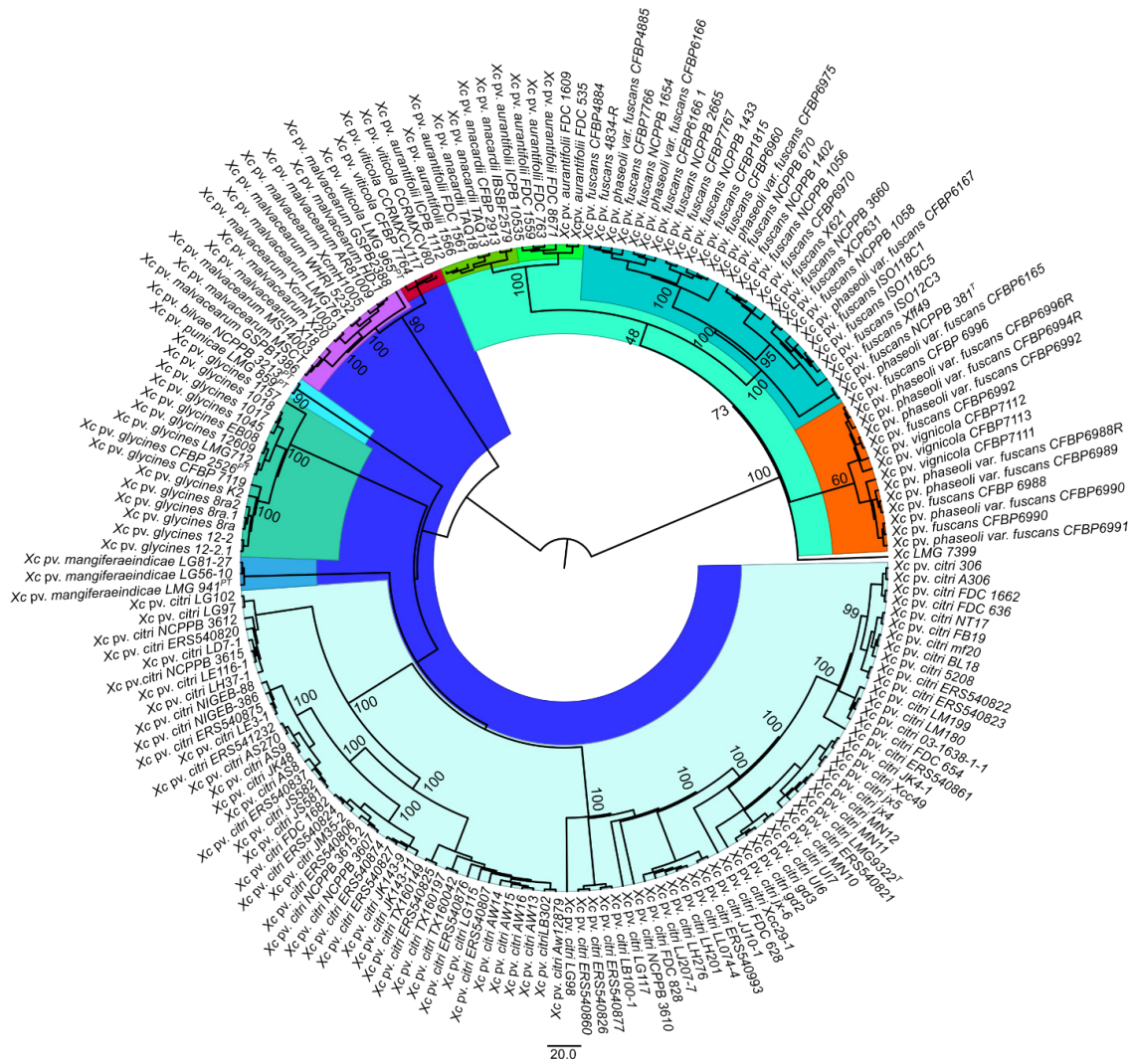


Fig. 8 Core gene phylogeny of the *Xanthomonas citri* genomes. Core genome phylogeny built using IQ-Tree software from the concatenated nucleotide sequences of 1,610 single copy orthologous of protein-coding genes from *X. citri* available in the NCBI database and a new genome of *X. citri* pv. *viticola* sequenced for this study. The tree structure shows that the genomes group, according to the pathotype. Colored highlight corresponds to a specific species/pathotype. Bootstrap values are indicated in the nodes.

Online Resource 2 Functional GOG annotation for the genomes of the strains CCRMXCV80, CCRMXCV117, CFBP 7764, and LMG 965 obtained using the web server eggNOG mapper

Code	Description	CCRMXCV80		CCRMXCV117		CFBP 7764		LMG 965	
		Value	% age	Value	% age	Value	% age	Value	% age
A	RNA processing and modification	1	0.09	1	0.09	1	0.09	1	0.09
B	Chromatin structure and dynamics	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
C	Energy production and conversion	182	16.62	180	16.47	180	16.50	182	16.70
D	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	40	3.65	41	3.75	41	3.76	41	3.76
E	Amino acid transport and metabolism	231	21.10	228	20.86	225	20.62	231	21.19
F	Nucleotide transport and metabolism	84	7.67	84	7.69	84	7.70	84	7.71
G	Carbohydrate transport and metabolism	199	18.17	199	18.21	191	17.51	203	18.62
H	Coenzyme transport and metabolism	116	10.59	116	10.61	111	10.17	116	10.64
I	Lipid transport and metabolism	119	10.87	119	10.89	121	11.09	120	11.01
J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	184	16.80	187	17.11	189	17.32	183	16.79
K	Transcription	205	18.72	204	18.66	214	19.62	200	18.35
L	Replication, recombination and repair	177	16.16	184	16.83	185	16.96	181	16.61
M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	278	25.39	278	25.43	274	25.11	276	25.32
N	Cell motility	41	3.74	42	3.84	43	3.94	42	3.85
O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	135	12.33	136	12.44	132	12.10	136	12.48
P	Inorganic ion transport and metabolism	217	19.82	206	18.85	208	19.07	207	18.99
Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	58	5.30	56	5.12	55	5.04	57	5.23

Online Resource 2 Continued.

Code	Description	CCRMXCV80		CCRMXCV117		CFBP 7764		LMG 965	
		Value	% age	Value	% age	Value	% age	Value	% age
R	General function prediction only	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
S	Function unknown	796	72.69	802	73.38	816	74.79	791	72.57
T	Signal transduction mechanisms	158	14.43	160	14.64	158	14.48	157	14.40
U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	81	7.40	84	7.69	94	8.62	84	7.71
V	Defense mechanisms	63	5.75	65	5.95	66	6.05	61	5.60
W	Extracellular structures	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Y	Nuclear structure	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Z	Cytoskeleton	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
-	Unannotated	3146	74.18	3242	74.79	3351	75.44	3341	75.21

Online Resource 3 KEGG annotation for the genomes of the strains CCRMXCV80, CCRMXCV117, CFBP 7764, and LMG 965 obtained through Blast searches in the KEGG database

Associated Function	Strains			
	CCRMXCV80	CCRMXCV117	CFBP 7764	LMG 965
Metabolism	2285	2210	2386	2419
Metabolic pathways	620	619	614	621
Biosynthesis of secondary metabolites	257	257	252	258
Microbial metabolism in diverse environments	161	161	159	162
Carbon metabolism	77	77	76	77
2-Oxocarboxylic acid metabolism	21	21	21	21
Fatty acid metabolism	20	20	20	20
Biosynthesis of amino acids	97	97	97	97
Degradation of aromatic compounds	12	12	12	12
Carbohydrate metabolism	139	66	266	272
Energy metabolism	132	132	132	131
Lipid metabolism	66	66	66	66
Nucleotide metabolism	75	75	75	75
Amino acid metabolism	240	239	240	239
Metabolism of other amino acids	40	40	38	40
Glycan biosynthesis and metabolism	51	51	46	51
Metabolism of cofactors and vitamins	143	143	139	143

Online Resource 3 Continued.

Associated Function	Strains			
	CCRMXCV80	CCRMXCV117	CFBP 7764	LMG 965
Metabolism of terpenoids and polyketides	28	28	28	28
Biosynthesis of other secondary metabolites	41	41	41	41
Xenobiotics biodegradation and metabolism	65	65	64	65
Genetic Information Processing	207	207	206	204
Transcription	4	4	4	4
Translation	81	81	81	80
Folding sorting and degradation	42	42	41	42
Replication and repair	80	80	80	78
Environmental Information Processing	231	228	228	223
Membrane transport	114	114	112	111
Signal transduction	116	113	115	111
Signaling molecules and interaction	1	1	1	1
Cellular Processes	193	193	241	292
Transport and catabolism	14	14	61	14
Cell growth and death	24	24	24	24
Cellular community - prokaryotes	107	107	107	205
Cell motility	48	48	49	49
Environmental adaptation	14	14	14	14
Total	2930	2852	3075	3152

CAPÍTULO III

**Insights into the gene content related to pathogenicity and virulence of *Xanthomonas citri*
pv. viticola in grapevines**

Artigo a ser submetido na: **BMC Genomics**

London, United Kingdom

Qualis CAPES: A1, Fator de Impacto: 3.53

Insights into the gene content related to pathogenicity and virulence of *Xanthomonas citri* pv. *viticola* in grapevines

Antonio Roberto Gomes de Farias¹, Wilson José da Silva Junior², Valdir de Queiroz Balbino², Ana Maria Benko-Iseppon², Tiago de Paula Lelis³, Jong Hyun Ham³, Marco Aurélio Siqueira da Gama¹, Elineide Barbosa de Souza⁴

¹ Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, 52.171-900, Brazil.

² Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, PE, 50670-901, Brazil.

³ Department of Plant Pathology and Crop Physiology, Louisiana State University, Baton Rouge, LA 70808, United States of America.

⁴ Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, 52.171-900, Brazil.

ABSTRACT

Background

Xanthomonas citri pv. *viticola*, causing the grapevine bacterial canker, is a severe threat to grapevine cultivation in the Northwest region of Brazil, with the potential to become a serious problem in other grape-growing areas in the world. The bacteria use several mechanisms to be recognized and subvert the plant defense, generally associated with bacterial secretion systems, such as secreting effector proteins and sensing apparatus. Over the last years, the availability of whole-genome sequences has facilitated the expansion of gene function studies, providing information on the roles of several genes and molecular studies of plant-pathogen interactions of *Xanthomonas* species. Even though the information about the molecular basis of the pathogenicity, virulence, and adaptive factors of *Xanthomonas* species and pathovars is vast in the literature, there is no information about the relationship between *X. citri* pv. *viticola* and grapevines.

Results

Here, we present the draft genome sequence of the strain CCRMXCV17 of *X. citri* pv. *viticola*, which shows high virulence to grapevines. The genome was sequenced, annotated, and compared with representative genomes of other *X. citri* pathovars, with a specific focus on virulence factors, regulatory mechanisms, and potential inherent adaptation to the host. The genome of strain CCRMXCV17 presented high genomic similarities with other *X. citri* pathovars, however, differences related to the virulence factors such as type II and III secreted proteins, and sensing mechanisms, which may favor the adaptation of this plant pathogenic bacteria to its host, were observed. The comparative analysis allowed us to infer that the genes encoding cell-wall degrading enzyme, type II and III secretion system, *quorum sensing*, two-component system, and polysaccharides are the main pathogenicity and virulence factors of *X. citri* pv. *viticola*. We constructed and characterized deficient strains for the type III secretion system and *quorum sensing* to evaluate the functions of these systems in the pathogenicity and virulence of the strain CCRMXCV17 and showed that these systems appear to be essential to the pathogenicity and full virulence of this pathogen in grapevines.

Conclusions

This study exposed for the first time the essential clues about the host-pathogen interaction of *X. citri* pv. *viticola*, providing the basis for the subsequent studies in this regard. This bacterium differs from the related pathovars in several features associated with the early or advanced pathogenicity development stages. Besides, the genes from the type III secretion system (*hrcC*, *hrcV*) and *quorum sensing* (*rpfC* and *rpfF*) seem to be required for biofilm formation, motility, pathogenicity, and virulence in *V. vinifera*.

BACKGROUND

The bacteria *X. citri* pv. *viticola*, the causal agent of the grapevine bacterial canker, became a serious threat to grapevine cultivation in the Northeastern region of Brazil since its first report in 1998 [1], where most of the table grape is produced. In the country, *X. citri* pv. *viticola* is the most critical grapevine disease, responsible for severe damage and representing a serious potential risk to Brazilian viticulture development [2]. After its first record, the bacterium was reported in vineyards in several Brazilian states. However, after eradication measures, the pathogen is now officially registered by the Brazilian Agriculture, Livestock and Supply Ministry (MAPA) as a quarantine pest limited to the states of Bahia, Ceará, Pernambuco, and Roraima [3]. Besides Brazil, this bacterium was reported in India [4], Thailand [5], and Africa [6]. Moreover, this disease, if established, may become a huge problem in other grape-growing areas, such as in America, Australia, and Europe [6].

For the infection and colonization of plants, *Xanthomonas* species presumably persist as epiphytes on the plant surface before entering the plant via natural openings or wounds [7]. Not differently, *X. citri* pv. *viticola* penetrates the plant tissues through natural openings such as stomata and hydathodes and/or over the wounds caused by cultural operations, strong winds [8], and trichome damage [9]. After penetration, these bacteria rapidly increase the population, colonizing the intercellular spaces, reaching the vascular system, and colonizing it [9]. However, for the success of the bacterial infection, the *Xanthomonas* species have developed different adaptation, pathological, and virulence mechanisms [10].

To breakdown the plant defenses and elicit disease, plant pathogenic bacteria produce molecular patterns or proteins associated with bacterial secretion systems to be recognized by the plants [11]. These patterns represent a complex of effector proteins (T3E) injected via the type III

secretion system (T3SS) in the host cell that target plant cell structures, that amend a manifold of cellular and physiological processes and modulate the host through the alteration of the regulation of genes or and by the recognition by plant proteins as a result of the host adaptation to the pathogen [12]. The T3E also may afford pathogenicity and/or host and tissue specificity [13], influencing the disease severity as well as host range [14]. The T3E effectors include two principal families, the TAL (transcription activator-like) effectors [15] and the *Xanthomonas* outer proteins (*Xop*), also known as non-TAL effectors, which are required for modulation of signaling in the plant defense response [16].

Another sensing system in pathogenic bacteria, the quorum sensing, is responsible for increasing the propensity for successful infections in several hosts as a result of the coordinated expression of virulence genes according to bacterial population levels [17]. Several studies have identified signaling groups via quorum sensing, enabling a better understanding of signaling networks and significantly advancing our understanding of the remarkable ability of microorganisms to modulate a wide range of biological. In *Xanthomonas* spp., the quorum sensing typically has the *rpfF*, *rpfC*, and *rpfG* genes as the primary signaling components diffusible signal factors (DSFs) as the signal molecule [18]. In this system, *rpfF* encoding a key enzyme required for its biosynthesis, and the *rpfC* and *rpfG* genes constitute a two-component system involved in signal perception and transduction, which activate a global transcription factor inhibitor ligand *Clp*, responsible for the expression of several genes, including those that encode the production of the bacterial plant-directed virulence factors [19].

Besides those mentioned above, the type II secretion system (T2SS) also displays an essential function for pathogenicity in *Xanthomonas* species [20, 21]. The T2SS is usually associated with the secretion of several other CAZymes (carbohydrate-active enzymes), which are involved in carbohydrate processing pathways and may indicate substrate preference and pathogenicity [14]. The CAZymes activities cover around 300 protein families classified in five main classes and their subclasses [22]. The diversity of secreted CAZyme in *Xanthomonas*, as well as its potential on pathogenicity, was studied previously in *Xanthomonas* species pathogenic to Solanaceae, with emphasis on the potential as effector and to infer about pathogenicity and bacterial growth strategies [14, 23]. Even though this highlight, the T2SS has not been widely studied regarding its function in virulence of plant pathogenic *Xanthomonas*. *In vitro* and *in planta* experiments have shown that the T2SS responsible for secreting toxins and degradative enzymes such as proteases, xylanases [20, 21], cellulase, and cellobiosidase [24] contributing to the virulence of *X. vesicatoria* and *X. oryzae* pv. *oryzae*.

Over the past years, the availability of genomic sequences from *Xanthomonas* species has facilitated the expansion of gene function studies involving targeted mutagenesis and cloning, screening libraries, and proteomics, providing information on the roles of several genes and molecular studies of plant-pathogen interactions of members of this genus. In addition, the site-directed mutagenesis has been usefully used to address their functions in the bacterial during the pathogen-host interaction, revealing the effect of genes and/or gene clusters in the pathogenicity, virulence, and adaptation of several *Xanthomonas* species and pathovars. More specifically, mutation of genes encoding core effectors leads to a decrease in the virulence and adaptation of specific strains, suggesting that there may be crucial functional redundancy among the effectors in pathotypes in the same species [11].

As noticed, the *in silico* genome characterization of several *Xanthomonas* species and pathovars has permitted us to understand and infer about the pathogenesis, virulence, and adaptation of this group of plant pathogens. For *X. citri* pv. *viticola*, there is no information about the relationship between *X. citri* pv. *viticola* and grapevines. Genome information of this bacterium is still incipient, with only a few studies in this regard [6, 25, 26]. In the present study, we aim to sequence the genome and investigate the pathogenicity and virulence-associated genes from the strain CCRMXCV17 of *X. citri* pv. *viticola* potentially involved in the plant-pathogen interaction.

RESULTS

Genome assembly and features. Whole-genome shotgun sequencing of the CCRMXCV17, a virulent strain of *X. citri* pv. *viticola* was performed. The *de novo* genome assembly using three the Unicycler assembly pipeline, resulted in 54 contigs > 500 bp. Afterward, to improve the genome assembly, the contigs were filtered using the BlobTools, and ten contigs were discarded because of contamination. After, the resulting contigs were ordered according to the complete genome of *X. citri* pv. *citri* 306 (Additional file1: Figure S1). The final draft assembly resulted in 42 ordered contigs consisting of 5,2 Mb with N50 values of 697,016 bp and a GC percentage of 64.38% (Table 1). The assembled contig sequences were annotated using the RAST annotation *pipeline*, resulting in 4,857 protein-coding DNA sequences (CDSs), 55 tRNA genes (Table 1). The annotated genes are transcribed in the forward and reverse sense based on the orientation of DNA replication, corresponding (Fig. 1a). The functional annotation using the RASTtk pipeline also provides accurate subsystem level annotations besides predicting the

number of genes in the genome. In the RASTtk seed subsystem annotations, 1,676 genes (26%) were placed into 331 subsystems, which the categories amino acid and derivatives comprised the highest number of genes (276) followed by 'carbohydrates' (208) 'Membrane Transport' (192), and 'Cofactors, Vitamins, Prosthetic Groups, Pigments' (168) (Additional file 2: Figure S2). Using Pfam, SignalP, TMHM, and EggNOG databases 3,627 (74.67%), 940 (19.35%), 1,063 (21.89%), and 3,787 (77.01%) of the ORFs could be classified to different groups, respectively (Table 1).

Genome-level taxonomic identification. The genomic sequence submitted to MiGA returned the pathotype *X. citri* pv. *viticola* LMG 965 and the *X. citri* pv. *citri* LMG 9322 species type with as the closest relatives (99.99% and 98.71% ANI, respectively), confirming the previous characterization as belonging to the *X. citri* species (p-value: 8.02e-05). After that, we compared the ANI values among *X. citri* pv. *viticola* and selected strains of pathovars of *X. citri* (Table 2). The results showed that the mutual values between the strain CCRMXCV17 and other *X. citri* pv. *viticola* were always close to 100% (>99.98), while among the other *X. citri* pathovars, it was above 98.60% (Additional file 3: Figure S3).

The alignment showed that the strain CCRMXCV17 genome is considerably like the genome of *X. citri* pathovars (Fig. 1b and Additional file 3: Figure S3). A general comparison showed no significant gene insertion or deletion of large regions in the *X. citri* pv. *viticola* CCRMXCV17 strain comparing to the other pathovars, but significant local collinear blocks inversion occurred (Additional file 4: Figure S4). The comparison of the whole genome sequences at the species level revealed that the locations of homologous genes present a high level of conservation. However, variations in either presence or absence of genes was observed for each pathovar (Fig. 1b). Regions with low similarity among the genomes occurred frequently and distributed randomly.

Secretion systems. For the secretion systems, we identified the six different systems encoded by the Gram-negative bacteria (type T1SS-T6SS) (Fig. 2) and its respective delivery proteins to the extracellular milieu and/or into the host cells cytosol by the T2SS and T3SS (Fig. 3 and Additional file 5). With focus on the secretion systems involved in the pathogenicity and virulence, the analysis also showed the highly conserved T2SS gene clusters, the *xcs* and *xps*. The *xcs* is encoded by 12 genes (*xcsC* to *xcsN*), while by 11 genes (*xpsD* to *xpsN*, with the *xpsE* with two extra copies in the genome, encoded the *xps* cluster (Fig. 2a, Fig. 2b, and Additional file 6). The Type III secretion system (T3SS) composed of the hypersensitive response and pathogenicity (*hrp*) gene clusters, is also present in the *X. citri* pv. *viticola* and composed of 27 genes (Fig. 2c; Additional file 6), extending from a tRNA-Arg-CCG upstream to the *hpaF* to *hpa2* in a region of

approximately 26,148 bp. Two hypothetical proteins of 195 bp and 144 bp are located between the genes *hrpF* and *hapB*, and *hrcC* and *hpa2*, correspondingly. The *hrp* gene cluster is comprised of nine *hrp* genes (*hrpB1*, *hrpB2*, *hrpB4*, *hrpB5*, *hrpB7*, *hrpD5*, *hrpD6*, *hrpE*, and *hrpF*), six *hpa* genes (*hpaA*, *hpaB*, *hpaP*, *hpa1*, *hpa2*, and *hpaF*), and nine *hrp* conserved *hrc* genes (*hrcC*, *hrcJ*, *hrcN*, *hrcQ*, *hrcR*, *hrcS*, *hrcT*, *hrcU*, and *hrcV*) (Additional file 6).

Type III secreted effector proteins. The prediction and comparative analysis of the T3E repertoire of *X. citri* pv. *viticola* with other *X. citri* pathovars permitted the identification of effectors that are pathovar-specific and consequently distinguishing them from the host pathogenic specificity (Fig. 3a). A total of 27 out of the 64 T3E gene families were found over the *X. citri* pv. *viticola* strains. Only seven T3E genes (*HpaA*, *XopAW*, *XopAZ*, *XopII*, *XopK*, *XopL*, and *XopZ*) were shared among all the pathovars. Only one gene (*XopB*) seemed to be more specific to the pathovar *viticola* and was shared only with the pathovar *bilvae*.

Cell-wall degrading enzymes (CWDE) and CAZymes. Genome analysis revealed the presence of the genes encoding for the synthesis and secretion of CWDE in *X. citri* pv. *viticola*. A total of 26 genes encoding cellulolytic, hemicellulolytic, and pectolytic enzymes were identified in the genomes of *X. citri* pv. *viticola*. From these, 10 genes are encoding for cellulolytic, 11 for hemicellulolytic, and five for pectolytic enzymes (Additional file 6). All these enzymes were highly conserved among the pathovars *viticola*, *citri*, *mangiferaeindicae*, and *glycines*.

We predicted a total of 99 carbohydrates CAZymes families distributed among the pathovars, revealing groups present or absent in a specific pathovar (Fig. 3a). The pathovar *viticola* presented 91 out of the 99 CAZymes families present in the genomes used for comparisons, with the Glycosyl Transferase Family 2 (GT2), glycosyltransferase family 4 (GT4) and glycoside hydrolase family 23 (GH23) (7) as the most predominant, with 10, 8, and 7 genes, correspondingly. Among the CAZymes present in the *X. citri* pv. *viticola* genome, one is present only in this pathovar, the GH12, which encodes glucanases with the activity of endoglucanase; xyloglucan hydrolase; β -1,3-1,4-glucanase; xyloglucan endotransglycosylase (<http://www.cazy.org/GH12.html>).

Virulence-related associated to surface structure and appendages and environmental sensing. Both flagellar and chemotaxis associated genes are conserved in the *X. citri* pv. *viticola* strains. This bacterium presents 33 genes related to flagella and its regulation, which are homologous among the close related pathovars, with exception to the pathovars *mangiferaeindicae* and *bilvae*. The same pattern was observed for the chemotaxis associated proteins, from which 18 predicted in the *X. citri* pv. *viticola* genome are shared between all the other pathovars used for comparisons,

with exception of the *cheY* absent in the *pv. citri*, and *cheA* and *cheR2* absent in the *pv. mangiferaeindicae* (Additional file 5). In addition, an extensive repertoire of genes for the type IV pili and fimbrial adhesins 22 out of the 31 previously described in *Xanthomonas* spp. Also, nonfimbrial adhesins, were predicted in the *X. citri pv. viticola* genome, however with some variations among the strains, in which in the strain CFBP 7764 these genes were not detected (Additional file 5).

Variations in the genes encoding for other virulence factors were observed in *X. citri pv. viticola* in relation to other *X. citri* pathovars. Out of 28 TonB-Dependent Outer Membrane Transporters (TBDTs) reported in others *Xanthomonas* spp., eight were predicted in the *X. citri pv. viticola*, from which only *btuB*, described in *X. campestris pv. campestris* strain ATCC 33913, is unique for this bacterium (Additional file 5). Also, large variation was observed regarding to the Lipopolysaccharide (LPS) genes of *X. citri pv. viticola*, presenting nine out 17 genes (Additional file 5), differing from the others pathovars of the species. Differently from the TBDTs, a large number of genes related to the Two-Component Systems (STCRs), Methyl-Accepting Chemotaxis Proteins (MCPs), quorum sensing (QS), and extracellular polysaccharide (EPS) were predicted in the *X. citri pv. viticola* genome, which comprises 66 out of 82, 23 out of 27, 10 out 11, and 12 out 13 respectively, without no single genes in the *X. citri pv. viticola* genome (Additional file 5).

Characterization of the T3SS and quorum sensing system mutants. The swimming ability of the mutants $\Delta hrcV$, $\Delta rpfC$, and $\Delta rpfF$ had a significant reduction ($p < 0.05$) when compared to the wild-type CCRMXCV17, with higher reduction for the $\Delta rpfF$ (Fig. 4a). For the swarming ability, there was not observed significant reduction, except for the $\Delta hrcC$ strain (Fig. 4b). Concerning to the biofilm formation of the mutant strains in polystyrene tubes, all of them displayed a significant ($p < 0.05$) reduction (Fig. 4c). The decrease in motility was more significant in the mutants for the QS $\Delta rpfC$ and $\Delta rpfF$ (Fig. 4h). These two mutants also showed a significant ($p < 0.05$) decrease in the EPS production, which was not observed for the $\Delta hrcC$ and $\Delta hrcV$ strains (Fig. 4d).

Plant inoculation showed that the mutation in the T3SS and QS affected the pathogenicity and virulence of *X. citri pv. viticola* strain CCRMXCV17 on grapes (Fig. 5). The plants inoculated with the wild-type started to express the typical water-soaking lesions, followed by the necrotic lesion, surrounded by a yellow halo, after three days after inoculation (Fig. 5a) and no lesions were observed for the negative control (Fig. 5b). No lesions were observed until 28 days after inoculation for the $\Delta hrcC$ and $\Delta hrcV$ (Fig. 5c and Fig. 5d), while the $\Delta rpfC$ and $\Delta rpfF$ strains showed similar symptoms to the wild type (Fig. 5e and Fig 5f). However, the incubation period

increased an average of 4,67 and six days for the strains *ΔrpfC* and *ΔrpfF*, correspondingly. At 28 days after inoculation, the lesion lengths had an average of 5.97 mm (wild-type CCRMXCV17), 3.74 mm (*ΔrpfC*), and 3.73 mm (*ΔrpfF*) (Fig. 5g). The reduction in the incubation period and severity of the symptoms for the *ΔrpfC* and *ΔrpfF* strains were statistically significant ($p < 0.05$) when comparing to the wild-type strain CCRMXCV17 (Fig. 5g and Fig. 5h).

DISCUSSION

We sequenced the genome of the strain CCRMXCV17 of *X. citri* pv. *viticola* to characterize the pathological and virulence factors of *X. citri* pv. *viticola*. The strain CCRMXCV17 was assigned as *X. citri* pv. *viticola* with 99.99 of ANI with the pathotype LMG 965, confirming the identity of the strain [27]. Furthermore, high identity was observed between the CCRMXCV17 and other *X. citri* pathovars, with an ANI not lower than 98.63% (Additional file 3: Figure S3), indicating high genetic similarity between the pathovars supporting these findings. As these pathovars are genetically similar, they probably have small differences in the gene content for pathogenicity, virulence, and host specificity, the focus of our investigation. Based on the draft genome sequence of the CCRMXCV17 and additional strains available in the NCBI database, we performed the genome-wide analysis of the probable determinants of pathogenicity and virulence necessary for the infection process of *X. citri* pv. *viticola* in grapes, compared to other strictly *X. citri* pathovars causing disease in trees and herbaceous plants.

In the genome of *X. citri* pv. *viticola* were identified the six secretion systems (Additional file 6), from which the T1SS, T2SS, and T3SS are described as contributing to the virulence of *Xanthomonas* spp. in its hosts. For the T1SS, were identified three genes encoding for the structural proteins (*hlyD*, *hlyB*, and *tolC*), and genes with homology to the genes *Ax21* and *raxC* (Additional file 6). From these, the *TolC* was shown to be required for pathogenicity of *Xylella fastidiosa* in *V. vinifera* grapevines [28], while the T1SS secreted *Ax21*, was shown to activate the immunity of rice plants against *X. oryzae* pv. *oryzae* PXO99, and the genes *raxA*, *raxB*, *raxC*, and *raxST*, required for the secretion of *Ax21* [29]. In *X. citri* pv. *viticola*, only the *raxC* gene was predicted. However, the genes *raxA*, *raxB*, and *raxST* were assigned by KEGG and RAST annotation. However, when compared with the reference genes, only shows the similarity of 23.19%, 37.37%, and 30%, respectively (Additional file 6).

Several pathogenic and nonpathogenic Gram-negative bacteria use the T2SS to translocate effectors proteins from the cytosol into the extracellular milieu. The T2SS associated proteins are

secreted by a two-step process, through either the sec-dependent pathway (Sec) [30], twin-arginine (Tat) pathway [31], or by the T2S apparatus. Both the Sec and Tat pathways were found in the genome of *X. citri* pv. *viticola* with high similarity with the other *X. citri* pathovars. Besides, the T2SS apparatus, which is composed of 12 to 16 (*gspA-O* and *S*) with the core formed organized in one large the operon *gspCDEFGHIJKLMNO* [32], is present highly conserved in *X. citri* pathovars analyzed (Additional file 6). *X. citri* pv. *viticola* presents the *xcs* and *xps*, which are also present in *X. citri* pv. *citri* and *X. campestris* pv. *campestris* [33].

As showed, *X. citri* pv. *viticola* harbors a vast repertoire of CWDE (Additional file 1), which are secreted by the T2SS apparatus, and are responsible for degrading the first physical barrier against pathogen attack and release the nutrients during the colonization process of the plant, characterizing as essential to the process of infection and colonization [7]. The difference in the CWDE gene content among the distinct *X. citri* pathovars can be specific to the host and or tissues, like *X. oryzae* pv. *oryzae* and *X. oryzae* pv. *oryzicola* that have the pathovar differentiation based on the ability to infect specific tissues into the same plant [35]. Besides the classic CWDE, the T2SS is generally related to the secretion of CAZymes families of enzymes involved in carbohydrate processing pathways, which, when present in bacterial strains, can indicate substrate preference and pathogenicity, reflecting differences in epidemiology and niche survival [14]. We observed that the CAZymes family profiles of *X. citri* pv. *viticola* were similar to *X. citri* pv. *citri* strain 306 profile, sharing the subfamilies GH13_10 and GH13_23, present only in these two pathovars, however the family GH12, is present in *X. citri* pathovars *viticola*, *bilvae*, and *malvacearum*, is absent in *citri*, which, together with the pathovar *glycines* possess the AA3 and GH24, and GH6 and GH97 exclusive for these pathovars (Fig. 3b). These specific profiles may confirm the specificity of host and pathogenicity, given the difference in the host structure tissue composition. However, as the pathovars share most of the CAZymes families, may indicate they share similar strategies for degrading plant cells [14]. However, further functional characterization of the specific role of these genes should be done to determine the real function in *X. citri* pv. *viticola*, once appear to have a significant difference in identity, regulation, and specificity of the T2SS substrates in the different *Xanthomonas* spp. [20].

Even though various virulence factors contribute to the pathogenicity of *Xanthomonas* species, the type III effectors are commonly associated with host-specificity and host-pathogen interaction and co-evolution, resulting in common sense that the T3SS and its effectors are the primary virulence and pathogenesis mechanism of these bacteria. Here, we used the available repertoire of T3Es reported in several bacteria species, to identify the T3E in the *X. citri* pv. *viticola*

genomes and compare to the *X. citri* pathovars profile. Consistently, the most predicted virulence factors, the T3Es are diverse among the *X. citri* pathovars, whereas a significant level of conservation occurs between the *viticola*, *citri*, and *bilvae* (Fig. 3a). A core of only seven effectors (*HpaA*, *XopAW*, *XopAZ*, *XopII*, *XopK*, *XopL*, and *XopZ*) was detected in the genomes, which includes three (*XopK*, *XopL*, and *XopZ*) found as part of the core between *X. citri* pv. *citri* and *X. arboricola* pv. *pruni* detected by Garita-Cambronero et al. [35]. Regarding the pathogenicity, in *X. euvesicatoria* 17 T3Es were able to inhibit the plant immunity triggered (PTI) by the domain *flg22* in *Arabidopsis thaliana* [36] and, from these, the T3Es *xopB*, *xopE2*, *xopL*, *xopN*, *xopV*, *xopX*, and *xopZ* are present in *X. citri* pv. *viticola* (Fig. 3a). Further functional studies comprising these PTI inhibitors would be useful to understand their role to sidestep the primary plant defense mechanisms and the development of a compatible plant-pathogen interaction, with particular attention to the *xopB*, which is present only in *X. citri* pv. *viticola* and *X. citri* pv. *bilvae*, among the *X. citri* pathovars, which was shown to as suppress plant immunity [37] and inhibited plant defense responses [38] in *X. euvesicatoria*. Furthermore, this comparative analysis highlighting T3E significantly diversity among the pathovars, that could determine the pathovar-specific pathogenicity [13].

Another essential and primary pathogenesis and virulence mechanism present in the genome of Gram-negative bacteria, the QS involved in detecting and responding to fluctuations in cell numbers, it was also predicted in *X. citri* pv. *viticola* (Additional file 6). The QS system is composed of the *rpf* gene cluster (regulation of pathogenicity factors). It encodes the components of the signaling molecules of the DSF in *Xanthomonas*, which regulates several processes, including biofilms formation and the production of virulence factors in pathogenic bacteria. According to Ng and Bassler [39], the DSF signals enables the bacteria to establish in new habitats, adapt to environmental fluctuations, resist host defense and antibiotic action, strengthen competitiveness, and take benefit of new nutrient sources. *In silico* analysis showed that *rpfF-rpfC-rpfG* genes are highly conserved in plant pathogenic bacteria from the genera *Xanthomonas* and *Xylella*, as well as no plant-related species [40], as we predicted in the *X. citri* pathovars *viticola*, *citri*, and *glycines* (Additional file 5). The absence of the *rpfF* and *rpfC* might be because of the draft state of the genome sequence.

Given the function and importance of the *Xanthomonas* T3SS and QS system to secrets effector proteins into the plant cell and control the motility and biofilm formation, respectively, we constructed mutants deficient in the T3SS We deleted the *hrcC* and *hrcV* genes, structural components from the *hrc* gene cluster from the T3SS, which functions as a channel for the

secretion of T3Es into plants [41]. Also, we made the constructions for the QS STCRs *rpfC* and *rpfF* to evaluate the contribution of these systems in the pathogenicity and virulence of *X. citri* pv. *viticola*. The *in vitro* assays showed that the disruption of genes from both the T3SS and QS reduced the motility and biofilm formation and did not reduce the EPS production for the T3S mutants, but decreased for the QS system mutant (Fig. 4a to Fig. 4d). These results corroborate with [42] that found a significant reduction in biofilm and motility and increased EPS production in *hrp* deficient strains. These authors also verified through a proteomic study that the lack of the T3SS causes changes in the expression of proteins involved in metabolic processes, energy uptake, EPS production, bacterial motility, and outer membrane proteins. Probably, this is because of as the primary activating signal for T3SS gene expression, involves multiple membrane-bound regulatory systems, these regulatory systems coordinate T3SS gene expression with several other cellular activities such as motility, mucoidy, polysaccharide production, and biofilm formation [43]. Concerning to the QS system, c-di-GMP (Bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate), a secondary messenger used in signal transduction involved in EPS production, biofilm formation, quorum sensing, virulence, and flagellar mobility of plant pathogenic bacteria [44]. Studying the transcriptome of a deficient mutant ($\Delta rpfF$) during host infection Li and collaborators [45] verified that the DSF- mediated QS specifically modulates bacterial adaptation, nutrition uptake and metabolisms, stress tolerance, virulence, and signal transduction to favor host infection in *X. citri* pv. *citri*. In the same pathogen, Guo and colleagues [46] showed that the *RpfC/RpfG* system regulated genes several genes involved in chemotaxis and motility, flagellar biosynthesis, production of extracellular enzymes, and adhesins, stress tolerance, regulation, transport. As we had mutants deficient in the T3SS and QS systems, these pathways must be disrupted.

In the *in planta* inoculation essays, the T3SS mutants were not able to cause disease or hypersensitivity response (HR) (Fig. 5c and Fig. 5d). Supporting these results, Shah et al. [47] showed that the *hrcC* deletion mutant was nonpathogenic on wheat and unable to elicit a hypersensitive response in the non-host *Nicotiana benthamiana*. Likewise, several *hrp-hrc* mutants of *X. oryzae* pv. *oryzae* completely lost virulence in pathogenicity assays in rice plants [48]. Moreover, Wang et al. [49] showed that because of a deletion mutation in the *hrcV* gene in *X. euvesicatoria*, the bacteria did not secrete the *AvrBs3* and *AvrRxv* effectors, concluding that the secretion of T3E is strictly *hrp*-dependent. Also, the abilities of *X. oryzae* pv. *oryzae* to induce HR and to cause disease in rice leaves were abolished by knockout of *hrcV*, in the presence of the *AvrXa10*, suggesting that this effector requires T3SS to execute the following function [50], what

could have happened with the *hrcC* and *hrcV* mutants of *X. citri* pv. *viticola*, which did not develop symptoms in grapes seedling (Fig. 5c and Fig 5d), probably because some effectors are translocated in a *HrcV*-dependent manner in, like *AvrXa10* in *X. oryzae* pv. *oryzae* [50].

Concerning to the QS mutants, we detected that the mutation in these systems could affect the EPS production, motility, and biofilm formation of *X. citri* pv. *viticola* (Fig. 4b, Fig. 4f, and Fig. 4i). We also detected reduced virulence of the bacteria in susceptible grapes leaves (Fig. 5e and Fig. 5f), probably because of the QS system is required for the production of multiple pathogenicity factors, such as small-molecule DSF, motility and xanthan gum production [51], as well the regulation of additional genes affecting the bacterial population, including the cellulases, proteases and pectinases production [33]. The requirement of the QS for the full virulence of *X. citri* pv. *citri* in the citrus host was shown by [46]. They showed that the deletion of the *rpfF*, *rpfC*, and *rpfG* genes significantly reduced the number of lesions formed in Duncan grapefruit leaves and that the three QS genes control a core group of other genes involved in chemotaxis and flagellar biosynthesis, genes encoding extracellular enzymes, and genes encoding adhesins, indicating the regulation of these functions by *rpfF*, *rpfC*, and *rpfG*. Thus, in *X. citri* pv. *viticola*, we hypothesize that the QS also regulates these functions, given that the EPS production, motility, and biofilm was reduced in the *in vitro* tests (Fig. 4b, Fig. 4f, and Fig. 4i).

Besides the primary and complex virulence and pathogenicity factors associated to the *Xanthomonas* species, the comparative genome analysis revealed an extensive repertoire of genes associated with different stages of the pathogenic process previously reported in this genus in the genome of *X. citri* pv. *viticola* (Additional file 6). These genes are highly conserved in the genomes of this pathovar and among the other from the *X. citri* species. We identified genes related to environmental sensings like the MCPs, TBDTs, and the STCRs, surface structure, and appendages (Additional file 6). Among then, that related to the Type IV pilus, which is associated with twitching motility, seems to be essential to the bacterial host-interaction and pathogenesis, contributing to the movement and formation of mature biofilms [52].

Other essential factors for plant pathogenic bacteria, the ability to sense and respond to their environment, characterizes a crucial step at initial stages of its interaction with the plant [36]. In *X. citri* pv. *viticola*, a large number of genes are involved with environmental sensors were predicted, which includes the TBDTs (8), STCRs (66), and MCPs (22) (Additional file 2). The TBDTs of *X. citri* pv. *viticola* is similar to pathovar *citri*, *bilvae*, *glycines*, and *malvacearum*, however, in a smaller number. The TBDT is an efficient transport system for nutrient uptake through the outer membrane. Genes coding for TBDTs are involved in carbohydrate, or

polysaccharide utilization are often associated with genes required for sensing, binding, degradation, and transport through the bacterial envelope [53]. In *Xanthomonas* species, the TBDTs are related to different infection mechanisms such as biofilm formation and transition to sessile lifestyle [54] and acquisition of the substrates from the host plants in others *Xanthomonas* species [13]. On the other hand, the MCPs highly conserved between the *X. citri* pathovar, in *X. citri* pv. *citri* MCP-mediated chemotaxis was found as an essential step in the process of pathogenicity and colonization of plant tissue, by directing the response to the environmental condition followed by motility towards or against the chemical signal and profile possibly is related to the host specificity, as well as a result of the evolution process during the plant-pathogen interactions [54]. In our comparative analysis, only a gene (*tsr*, annotated as a chemotaxis protein) encoding a chemotaxis protein in the *X. citri* pathovars *citri*, *mangiferaeindicae*, *punicae*, *bilvae*, and *glycines* was not detected in *X. citri* pathovars *viticola* and *malvacearum*, indicating that this gene might be essential for the disease induction and colonization of this bacteria in their host. Garita-Cambronero et al. [35] also verified MCPs genes (XCC0324 and XCC0276) present in *X. arboricola* pv. *pruni* and absent in *X. citri* pv. *citri*, which can probably restrict the host range of *X. arboricola* pv. *pruni*. Furthermore, the STCRs, important for modulating extracellular and intracellular signals associated with the biofilm formation, chemotaxis, and motility, which include the genes for QS systems (discussed previously), were predicted in *X. citri* pv. *viticola* (Additional file 2). Out of 83 STCRs reported in *Xanthomonas* species, 66 are present in *X. citri* pv. *viticola*, from which most of them are conserved in the related pathovars, indicating the essentiality of these signal transductions in the interaction of the bacteria with their respective hosts [35].

CONCLUSION

Comparative genomic analysis has provided an essential contribution to the understanding of the mechanisms that might have a function in the *Xanthomonas* species host-pathogen interaction. Here we expose for the first time the important clues of such mechanisms of *X. citri* pv. *viticola*. After the comparative analysis of *X. citri* pv. *viticola*, it was determined that this bacterial differed from the related pathovars in several features associated with the early or advanced stages of the pathogenicity development. This genomic analysis suggests the primary genes potentially involved in the pathogenesis of *X. citri* pv. *viticola* in grapes. This plant pathogen has slight differences associated with environmental sensing such as the MCPs, TBDTs, CWDE, T3Es, features associated with the flagellin protein, and components of the type IV pilus, compared

to others *X. citri* pathovar. Also, we provide the basis for more advanced studies in the "omics" of this plant pathogen to, eventually, open new ways for the expansion of innovative control strategies of the grapevine bacterial canker. This work also determines that the presence of the *hrcC*, *hrcV*, *rpfC₂* and *rpfF* genes from the T3SS and QS system, corresponding, seems to be required for biofilm formation, motility, pathogenicity, and virulence in *V. vinifera* cv. Crimson Seedless.

MATERIAL AND METHODS

Whole-genome sequencing and genome-level taxonomic identification. Genomic DNA *X. citri* pv. *viticola* CCRMXCV17 was purified using the MiniPrep kit for bacterial genomic DNA extraction (Axygen Biosciences, USA) as recommended by the manufacturer. A standard paired-end (PE) sequencing library was prepared with the Illumina Nextera XT DNA Library Prep Kit v4 (Illumina), as recommended by the manufacturer and sequenced on Illumina HiSeq. 2500 platform at 100 × coverage. All good quality paired reads (Phred quality score $Q \geq 20$) after filtered out using FASTX-Toolkit (v. 0.0.13) (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/) and the software Sickle v.1.33 (<https://github.com/najoshi/sickle>), were assembled using the Unicycler pipeline [56]. The assembled contigs were searched for probable contamination using the BlobToolKit (<https://github.com/blobtoolkit/blobtools2>) [56] and the contaminated contigs removed. After that, the genome contigs were scaffolded using MAUVE (v.2.25) [57] detected using the Microbial Genomes Atlas (MiGA) webserver [58] and among selected reference genomes of different pathovars of *X. citri* available in the GenBank database (Table 2) using the OrthoANI software [59]. Annotation was performed using the web-based Rapid Annotation Using Subsystem Technology (RAST) annotation server [60]. The annotated features visualized using the CGView Server [61]. Orthology annotation searches were carried in terms of the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) against the KEGG database through the BlastKOALA [62]. Besides, the CCRMXCV17 genome was also scanned for clusters of orthologous groups (COGs) annotations using the eggNOG-mapper server v. 5.0 with default options (<http://eggno-mapper.embl.de/>) [63]. Carbohydrate-Active enZYmes and associated enzyme (CAZy) coding sequences in the genome were annotated using the automated Carbohydrate-active enzyme Annotation web server (dbCAN meta server - <http://bcb.unl.edu/dbCAN2/blast.php>) [64]. Putative signal peptides and transmembrane helices were predicted using SignalP 5.0 [65] and TMHMM 2.0 [66], respectively.

Scanning for secretion systems, effector proteins, and other virulence-related genes. To characterize the effector repertoire of each of the genomes used in this study, we first downloaded from GenBank all the *Xanthomonas* T3E, listed on genes listed on The *Xanthomonas* Resource (<http://www.xanthomonas.org/t3e.html>) [16]. Using this dataset, the 64 sequences of the T3E family associated with *Xanthomonas* species. The identification of the presence and/or absence of the effector genes, we performed BLASTP searches were performed using standalone BLAST v2.10.0 [67]. The results were filtered at a minimum of 80% identity and 80% coverage and E-value of 1e-25. The blast search results were then clustered manually and presented as a heat map generated using Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>).

The variation of pathogenicity and virulence characteristics of *X. citri* pv. *viticola* and related pathovars was assessed regarding the presence of genes previously reported in *Xanthomonas* spp. (reviewed by [11, 35]). These genes comprise environmental sensors TBDTs, STCRs, and MCPs, adherence and motility (structure and regulation of flagella, type IV pilus, and non-fimbrial adhesins), production of xanthan gum, *quorum sensing*, cell wall degrading enzymes, secretion systems (types I to IV). We then performed BLASTP searches heat map construction as described previously.

Construction of mutants for structural genes from the T3SS and quorum sensing system

Bacterial strains and growth conditions. Bacterial strains used in this section are listed in Table 3. The strains were routinely recovered from storage in 30 % (w/v) glycerol at -70 °C. The *X. citri* pv. *viticola* strains were grown as beforehand mentioned in NYDA or NYD (NYDA without agar) medium. All strains of *Escherichia coli* were grown in Luria-Bertani (LB) broth or LB agar media at 30 °C or 37 °C. Antibiotics were supplemented as needed at the concentrations of 20 µg/ml for gentamycin and 100 µg/ml for Nitrofurantoin.

Primer design and molecular techniques. Specific primers were designed based on the specific annotated gene sequence using the NCBI online tool Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) [68]. The oligonucleotides sequences were synthesized by the Bioneer Company (Oakland, USA). For all of the purposes, the genomic DNA was extracted from overnight cultures of *X. citri* pv. *viticola* grown in the respective medium, using the GenElute Bacterial Genomic DNA Extraction kit (Sigma- Aldrich, Missouri - USA). *E. coli* plasmid DNA was extracted from cultures grown in the same above conditions using the ZR Miniprep-Classic Kit (Zymo Research, California - USA). PCR reactions were performed in a DNA Engine® Thermal Cycler machine (Bio-Rad Laboratories, California - USA) with initial denaturation of 94 °C/60 sec, 34 cycles of denaturation 94 °C/30 sec, annealing 55 °C/30 sec,

extension 72 °C/60 sec, and final extension 72 °C/7 min. PCR products were purified using the Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, California - USA). The NanoDrop ND-100 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA) was used to assess the quality and quantity of DNA samples.

Generation of *rpfC*, *rpfF*, *hrcC*, and *hrcV* insertion mutants of CCRMXCV17. Procedures for DNA cloning and amplification were conducted according to Sambrook [71]. When necessary, the plasmid DNA was digested with specific endonucleases: *rpfC* and *hrcC* (EcoRI-HF), *rpfF*, and *hrcV* (XhoI and Pst). PCR primers used to create deletion mutations are listed in Additional file 7. The pSC-A-amp/kan containing the gene fragments were used to transform *E. coli* cells by electroporation using a GenePulser unit (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) at 1.5 kV with 2 µl DNA and 25 µl competent cells. Triparental mating using the helper plasmid, pRK2013::Tn7 [69], was used to transform *X. citri* pv. *viticola*.

EPS production. The phenotype of the wild type and mutants strains of *X. citri* pv. *viticola* was first assessed by using plate assays. It was used the rapid and semi-quantitative methods for bacterial EPS production and extracellular enzyme activity [51], with slight modifications. Briefly, bacterial suspension was obtained from 36 h old culture of each strain in NYD at 30 °C. The suspension was washed twice and resuspended in fresh NYD to a final OD₆₀₀ of 1.0. For EPS production, 5 µl of the bacterial suspension were dropped on a nutrient agar (NA) plate supplemented with 2% of sucrose, followed by incubation at 30 °C for 48 h. The difference in the EPS production was evaluated based on colony morphology and size, and the results were the average of three independent experiments.

Biofilm formation assay. The biofilm formation ability of the wild type and mutants was evaluated in glass tubes according to a protocol adapted from [72]. Briefly, 250 µl of the bacterial suspension was added in each tube containing 1 ml of LB supplemented with the Gentamicin and Nitrofurantoin antibiotic, except for the wild type for which it was used only Nitrofurantoin. The negative control constituted only culture medium (1.25 ml) added antibiotic. The formation of biofilms on the walls of the tubes was determined after 48 h of incubation at 30 °C. The content of the was removed, and the tube walls were washed three times with 1.25 ml of sterile 0.9% NaCl solution. The plates tubes were placed in an oven at 60 °C for the biofilm fixation for one hour. In sequence, the adhered layer of cells was stained with 1.25 ml of 0.4% crystal violet for 15 min at room temperature, and the tubes were washed with distilled water. The biofilm was solubilized by adding 1.25 ml of 99.5% ethanol per tube for 10 min with the cap closed to prevent evaporation. Lastly, the optical density at 570 nm (OD) was measured using a spectrophotometer. The average

of three replication expressed the results.

Motility assays. For the swarming and swimming motility assays, NA medium added 0.3% and 0.7% agar and dried during 1 h in the hood were inoculated with 2 μ l of 10^8 CFU/ml grown to mid-log phase at 30°C in NYD medium. The inoculated Petri dishes were then incubated at 30°C for 96 h motility zone was measured at different times of incubation. Three replicates were performed for every test, and the experiments were performed three times. The results were expressed as the average of three independent experiments.

Virulence assay on grapes seedlings. Sixty-day-old grapes seedlings (*Vitis vinifera* variety Crimson Seedless) were used for the virulence assay of the wild type and mutant strains. All seedlings were grown in a greenhouse at 30°C with a photoperiod of 16 h and > 80% RH. The strains were cultured in NYDA medium, and the concentration of the bacterial suspension was adjusted with 10 mol/l MgSO_4 to an OD_{570} of 0.4 (1×10^8 CFU/ml). For disease symptoms assays, bacterial suspension (approximately 2.0 μ l) was infiltrated into the leaf with needleless syringes. Two areas on each side of the leaf mid-vein were infiltrated (wild-type, negative control, and two mutants strains). The excess inoculum was wiped from the leaf surface with a sterile paper towel. Three plants and one leave per plant were inoculated with each strain. Seedlings were kept at 100% humidity for 48 h after inoculation and were evaluated regarding the incubation period and symptom development, by scoring the presence or absence and measuring the diameter of the necrotic symptoms at 28 days after inoculation. After recorded the symptoms, isolations from inoculated leaves were attempted, and colony growth was recorded after 72 h on the NYDA medium. All inoculation tests were carried out following quarantine procedures of the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock, and Food Supply (MAPA). All the collected data regarding the mutants essay were submitted to Analysis of variance using the software Statistix version 9.

ABBREVIATIONS

ANI: Average Nucleotide Identity

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

CAZymes: Carbohydrate-Active Enzymes

CWDE: Cell-Wall Degrading Enzymes

DSF: Diffusible Signal Factors

EPS: Extracellular Exopolysaccharides

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LB: Luria-Bertani

LPS: Lipopolysaccharides

MAPA: Brazilian Agriculture, Livestock and Supply Ministry

MCP: Methyl-Accepting Chemotaxis Proteins

NA: Nutrient agar

NYDA: Nutrient Yeast Glucose Agar

QS: Quorum Sensing System

RAST: Rapid Annotation using Subsystem Technology

RPF: Regulation of Pathogenicity Factors

STCR: Two-Component Systems

T2SS: Type II Secretion System

T3E: Type III Effector Proteins

T3SS: Type III Secretion System

T4SS: Type IV Secretion System

T5SS: Type V Secretion System

T6SS: Type VI Secretion System

TAL: Transcription Activator-Like

TBDT: TonB-Dependent Outer Membrane Transporters

REFERENCES

1. Malavolta Junior VA, Almeida, IMG, Sugimori, MH, Ribeiro, IJA, Rodrigues Neto, J, Pires, EJP, Nogueira, EMC. Ocorrência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videira no Brasil. Summa Phytopathologica. 1999;36:262-4.
2. Rodrigues Neto J, Destéfano SAL, Rodrigues LMR, Pelloso DS, Oliveira Júnior LC. Grapevine bacterial canker in the State of São Paulo, Brazil: detection and eradication. Trop Plant Pathol. 2011; doi:10.1590/S1982-56762011000100006.
3. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 38, de 1º de outubro de 2018. 2018. http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/43461167/doi-2018-10-02-instrucao-normativa-n-38-de-1-de-outubro-de-2018-43461024. Accessed 13 Mar 2020.
4. Nayudu MV. Incitant of a New Bacterial Disease of Grape Vine. 1972; doi: 10.1111/j.1439-0434.1972.tb02539.x.
5. Buensanteai MN. Identification, development of detection method and survey of bacterial necrosis disease of grapevine in Thailand. Ds. Dissertation, Suranaree University of Technology. 2004. http://sutir.sut.ac.th:8080/sutir/bitstream/123456789/1267/2/natthiya_fulltext.pdf. Accessed 12 Mar 2020.
6. Midha S, Patil PB. Genomic insights into the evolutionary origin of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and its ecological relatives. Appl Environ Microbiol. 2014; doi: 10.1128/AEM.01654-14.

7. Büttner D, Bonas U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol Rev.* 2010; doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00192.x.
8. Nascimento ARP, Mariano R de LR. Cancro bacteriano da videira: etiologia, epidemiologia e medidas de controle. *Ciência Rural.* 2004; doi:10.1590/S0103-84782004000100050.
9. Sebastião J, Araujo DP, Bueno F, Cruz GB. Produção e caracterização de anticorpos policlonais contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* against *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. 2005; doi: 10.1590/S0100-204X2005000300015.
10. Zhang ZC, Zhao M, Xu LD, Niu XN, Qin HP, Li YM, et al. Genome-wide screening for novel candidate virulence related response regulator genes in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Front Microbiol.* 2018; doi: 10.3389/fmicb.2018.01789.
11. An S-Q, Potnis N, Dow M, Vorhölter F-J, He Y-Q, Becker A, et al. Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. *FEMS Microbiol Rev.* 2019; doi: 10.1093/femsre/fuz024.
12. Feng F, Zhou JM. Plant-bacterial pathogen interactions mediated by type III effectors. *Curr Opin Plant Biol.* 2012; doi: 10.1016/j.pbi.2012.03.004.
13. Jacques M-A, Arlat M, Boulanger A, Boureau T, Carrère S, Cesbron S, et al. Using Ecology, Physiology, and Genomics to Understand Host Specificity in *Xanthomonas*. *Annu Rev Phytopathol.* 2016; doi:10.1146/annurev-phyto-080615-100147.
14. Roach R, Mann R, Gambley CG, Chapman T, Shivas RG, Rodoni B. Genomic sequence analysis reveals diversity of Australian *Xanthomonas* species associated with bacterial leaf spot of tomato, capsicum and chilli. *BMC Genomics.* 2019; doi: 10.1186/s12864-019-5600-x.
15. Zhang J, Yin Z, White F. TAL effectors and the executor R genes. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2015.00641.
16. White FF, Potnis N, Jones JB, Koebnik R. The type III effectors of *Xanthomonas*. *Mol Plant Pathol.* 2009; doi: 10.1111/j.1364-3703.2009.00590.x.
17. Ham JH. Intercellular and intracellular signalling systems that globally control the expression of virulence genes in plant pathogenic bacteria. *Mol Plant Pathol.* 2013; doi: 10.1111/mpp.12005.
18. Deng Y, Wu J, Tao F, Zhang LH. Listening to a new language: DSF-based quorum sensing in gram-negative bacteria. *Chem Rev.* 2011;111:160–79.
19. Tao F, He YW, Wu DH, Swarup S, Zhang LH. The cyclic nucleotide monophosphate domain of *Xanthomonas campestris* global regulator Clp defines a new class of cyclic di-GMP effectors. *J Bacteriol.* doi: 10.1128/JB.01253-09.
20. Szczesny R, Büttner D, Escolar L, Schulze S, Seiferth A, Bonas U. Suppression of the AvrBs1-specific hypersensitive response by the YopJ effector homolog AvrBsT from *Xanthomonas* depends on a SNF1-related kinase. *New Phytol.* 2010; doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03346.x.
21. Solé M, Scheibner F, Hoffmeister AK, Hartmann N, Hause G, Rother A, et al. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* secretes proteases and xylanases via the Xps type II secretion system and outer membrane vesicles. *J Bacteriol.* 2015; doi: 10.1128/JB.00322-15.
22. Cantarel BI, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* 2009; doi: 10.1093/nar/gkn663.
23. Potnis N, Krasileva K, Chow V, Almeida NF, Patil PB, Ryan RP, et al. Comparative genomics reveals diversity among xanthomonads infecting tomato and pepper. *BMC Genomics.* 2011; doi:10.1186/1471-2164-12-146.

24. Jha G, Rajeshwari R, Sonti R V. Functional interplay between two *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* secretion systems in modulating virulence on rice. *Mol Plant-Microbe Interact.* 2007; doi: 10.1094/MPMI-20-0031.
25. Ferreira MASV, Bonneau S, Briand M, Cesbron S, Portier P, Darrasse A, et al. *Xanthomonas citri* pv. *viticola* affecting grapevine in Brazil: Emergence of a successful monomorphic pathogen. *Front Plant Sci.* 2019; doi: 10.3389/fpls.2019.00489.
26. Gama MAS, Mariano R de LR, da Silva Júnior WJ, de Farias ARG, Barbosa MAG, Ferreira MÁ da SV, et al. Taxonomic Repositioning of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 as *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 comb. nov. and Emendation of the Description of *Xanthomonas citri* pv. *anacardii*. *Phytopathology.* 2018; doi:10.1094/PHYTO-02-18-0037-R.
27. Seppey M, Manni M, Zdobnov EM. BUSCO: Assessing Genome Assembly and Annotation Completeness. In: Kollmar, M, editor. *Gene Prediction. Methods in Molecular Biology.* Springer Science+Business Media, LLC; 2019. P. 227-245.
28. Reddy JD, Reddy SL, Hopkins DL, Gabriel DW. ToIC is required for pathogenicity of *Xylella fastidiosa* in *Vitis vinifera* grapevines. *Mol Plant-Microbe Interact.* 2007; doi: 10.1094/MPMI-20-4-0403.
29. Da Silva FG, Shen Y, Dardick C, Burdman S, Yadav RC, De Leon AL, et al. Bacterial genes involved in type I secretion and sulfation are required to elicit the rice Xa21-mediated innate immune response. *Mol Plant-Microbe Interact.* 2004; doi: 10.1094/MPMI.2004.17.6.593.
30. Wandersman C. The general secretory pathway in bacteria. *Trends Microbiol.* 1993; doi: 10.1016/0966-842X(93)90043-Q.
31. Voulhoux R, Ball G, Ize B, Vasil ML, Lazdunski AE, Wu L-F, et al. Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. 2001; doi: 10.1093/emboj/20.23.6735.
32. Sandkvist M. Type II secretion and pathogenesis. *Infect Immun.* 2001; doi: 10.1128/IAI.69.6.3523-3535.2001.
33. Da Silva ACR, Ferro JA, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB, et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature.* 2002; doi: 10.1038/417459a.
34. Zou HS, Song X, Zou LF, Yuan L, Li YR, Guo W, et al. EcpA, an extracellular protease, is a specific virulence factor required by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* but not by *X. oryzae* pv. *oryzae* in rice. *Microbiol.* 2012; doi: 10.1099/mic.0.059964-0.
35. Garita-Cambronero J, Sena-Vélez M, Ferragud E, Sabuquillo P, Redondo C, Cubero J. *Xanthomonas citri* subsp. *Citri* and *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*: Comparative analysis of two pathogens producing similar symptoms in different host plants. *PLoS One.* 2019; doi: 10.1371/journal.pone.021979736.
36. Popov G, Fraiture M, Brunner F, Sessa G. Multiple *Xanthomonas euvesicatoria* type III Effectors Inhibit flg22-Triggered immunity. *Mol Plant-Microbe Interact.* 2016; doi: 10.1094/MPMI-07-16-0137-R.
37. Schulze S, Kay S, Büttner D, Egler M, Eschen-Lippold L, Hause G, et al. Analysis of new type III effectors from *Xanthomonas* uncovers XopB and XopS as suppressors of plant immunity. *New Phytol.* 2012; doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04210.x.
38. Priller JPR, Reid S, Konein P, Dietrich P, Sonnewald S. The *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* type-3 effector XopB inhibits plant defence responses by interfering with ROS production. *PLoS One.* 2016; doi: 10.1371/journal.pone.0159107.
39. Ng W-L, Bassler BL. Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. *Annu Rev Genet.* 2009; doi: 10.1146/annurev-genet-102108-134304.
40. Dow JM. Diffusible signal factor-dependent quorum sensing in pathogenic bacteria and its exploitation for disease control. *J Appl Microbiol.* 2016; doi: 10.1111/jam.13307.
41. Li L, Li RF, Ming ZH, Lu GT, Tang JL. Identification of a novel type III secretion-associated outer membrane-

- bound protein from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Sci Rep. 2017; doi:10.1038/srep42724.
42. Zimaro T, Thomas L, Marondedze C, Sgro GG, Garofalo CG, Ficarra FA, et al. The type III protein secretion system contributes to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* biofilm formation. BMC Microbiol. 2014; doi: 10.1186/1471-2180-14-96.
43. Diaz MR, King JM, Yahr TL. Intrinsic and extrinsic regulation of type III secretion gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. Front Microbiol. 2011; doi: 10.3389/fmicb.2011.00089.
44. Nakhamchik A, Wilde C, Rowe-Magnus DA. Cyclic-di-GMP regulates extracellular polysaccharide production, biofilm formation, and rugose colony development by *Vibrio vulnificus*. Appl Environ Microbiol. 2008;7 doi: 10.1128/AEM.00176-08.
45. Li L, Li J, Zhang Y, Wang N. Diffusible signal factor (DSF)-mediated quorum sensing modulates expression of diverse traits in *Xanthomonas citri* and responses of citrus plants to promote disease. BMC Genomics. 2019; doi: 10.1186/s12864-018-5384-4.
46. Guo Y, Zhang Y, Li J-L, Wang N. Diffusible Signal Factor-Mediated Quorum Sensing Plays a Central Role in Coordinating Gene Expression of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Mol Plant-Microbe Interact. 2012; doi:10.1094/MPMI-07-11-0184.
47. Shah SMA, Haq F, Ma W, Xu X, Wang S, Xu Z, et al. Tal1NXtc01 in *Xanthomonas translucens* pv. *cerealis* Contributes to Virulence in Bacterial Leaf Streak of Wheat. Front Microbiol. 2019; doi: 10.3389/fmicb.2019.02040.
48. Cho HJ, Park YJ, Noh TH, Kim YT, Kim JG, Song ES, et al. Molecular analysis of the hrp gene cluster in *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10859. Microb Pathog. 2008; doi: 10.1016/j.micpath.2007.12.002.
49. Rossier O, Wengelnik K, Hahn K, Bonas U. The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian bacterial pathogens. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; doi: 10.1073/pnas.96.16.9368.
50. Wang X, Zhang L, Ji H, Mo X, Li P, Wang J, et al. Hpa1 is a type III translocator in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. BMC Microbiol. 2018; doi: 10.1186/s12866-018-1251-3.
51. Tang JL, Liu YN, Barber CE, Dow JM, Wootton JC, Daniels MJ. Genetic and molecular analysis of a cluster of rpf genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. MGG Mol Gen Genet. 1991; doi: 10.1007/BF00260653.
52. Dunger G, Llontop E, Guzzo CR, Farah CS. The *Xanthomonas* type IV pilus. Curr Opin Microbiol. 2016; doi:10.1016/j.mib.2016.01.007.
53. Boulanger A, Zischek C, Lautier M, Jamet E, Rival P, et al. The plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* exploits N-acetylglucosamine during infection. MBio. 2014; doi: 10.1128/mBio.01527-14.
54. Mhedbi-Hajri N, Darrasse A, Pigné S, Durand K, Fouteau S, Barbe V, et al. Sensing and adhesion are adaptive functions in the plant pathogenic xanthomonads. BMC Evol Biol. 2011; doi: 10.1186/1471-2148-11-67.
55. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. PLoS Comput Biol. 2017; doi: 10.1371/journal.pcbi.1005595.
56. Challis R, Richards E, Rajan J, Cochrane G, Blaxter M. BlobToolKit - Interactive Quality Assessment of Genome Assemblies. G3 (Bethesda). 2020; doi: 10.1534/g3.119.400908.
57. Darling ACE, Mau B, Blattner FR, Perna NT. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. Genome Res. 2004; doi:10.1101/gr.2289704.
58. Rodriguez-R LM, Gunturu S, Harvey WT, Rosselló-Mora R, Tiedje JM, Cole JR, et al. The Microbial Genomes Atlas (MiGA) webserver: Taxonomic and gene diversity analysis of Archaea and Bacteria at the whole genome level. Nucleic Acids Res. 2018; 10.1093/nar/gky467.
59. Lee I, Kim YO, Park SC, Chun J. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average

nucleotide identity. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016; doi: 10.1099/ijsem.0.000760.

60. Aziz RK, Bartels D, Best A, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, et al. The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*. 2008; doi: 10.1186/1471-2164-9-75.

61. Stothard P, Grant JR, Van Domselaar G. Visualizing and comparing circular genomes using the CGView family of tools. *Brief Bioinform*. 2019 doi: 10.1093/bib/bbx081.

62. Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. 2017; doi: 10.1093/nar/gkw1092.

63. Huerta-Cepas J, Forslund K, Coelho LP, Szklarczyk D, Jensen LJ, Von Mering C, et al. Fast genome-wide functional annotation through orthology assignment by eggNOG-mapper. *Mol Biol Evol*. 2017; doi: 10.1093/molbev/msx148.

64. Yin Y, Mao X, Yang J, Chen X, Mao F, Xu Y. DbCAN: A web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Res*. 2012; doi: 10.1093/nar/gks479.

65. Almagro Armenteros JJ, Tsirigos KD, Sønderby CK, Petersen TN, Winther O, Brunak S, et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat Biotechnol*. 2019; doi:10.1038/s41587-019-0036-z.

66. Krogh A, Larsson B, Von Heijne G, Sonnhammer ELL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J Mol Biol*. 2001; doi: 10.1006/jmbi.2000.4315.

67. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, et al. BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. 2009; doi: 10.1186/1471-2105-10-421.

68. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. 2012; doi: 10.1186/1471-2105-13-134.

69. Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR. Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. 1980; doi: 10.1073/pnas.77.12.7347.

70. Alexeyev MF. The pKNOCK Series of Broad-Host-Range Mobilizable Suicide Vectors for Gene Knockout and Targeted DNA Insertion into the Chromosome of Gram-Negative Bacteria. *Biotechniques*. 1999; doi: 10.2144/99265bm05.

71. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. N.Y: Cold Spring Harb Lab Press. Cold spring Harbor; 2001.

-772. Tang PL, Pui CF, Wong WC, Noorlis A, Son R. Biofilm forming ability and time course study of growth of *Salmonella typhi* on fresh produce surfaces. *Int Food Res J*. 2012;19:71-6.

TABLES

Table 1. Genome statistics and general genome features of the *Xanthomonas citri* pv. *viticola* strain CCRMXCV17

Attribute	Value	% of the total
Genome size (bp)	5,2 Mb	-
CG content (%)	64.38	-
N50	697,016 bp	-
DNA contigs	42	-
Complete BUSCO (%) *	-	95.2
Total genes	4,912	100.00
Protein coding genes	4,857	98.88
RNA genes	55	1.12
Number of TASTtk SEED subsystems	331	-
Number of features in the subsystems	1,676	34.12
Genes assigned to COGs	3,787	77.01
Genes with Pfam domains	3,627	74.67
Genes with signal peptides	940	19.35
Genes with transmembrane helices	1,063	21.89

* percentage of genes found in the assembly completely (or partially) using BUSCO [27].

Table 2. Genome sequences used in this study

GenBank Assembly	Organism Name	Strain
This study	<i>X. citri</i> pv. <i>viticola</i>	CCRMXCV17
GCA_002564485.1	<i>X. citri</i> pv. <i>viticola</i>	CCRMXCV80
Farias et al (2020, in prep.)	<i>X. citri</i> pv. <i>viticola</i>	CCRMXCV117
GCA_000723725.1	<i>X. citri</i> pv. <i>viticola</i>	LMG 965
GCA_002899435.1	<i>X. citri</i> pv. <i>viticola</i>	CFBP 7764
GCA_000007165.1	<i>X. citri</i> pv. <i>citri</i>	306
GCA_000263335.1	<i>X. citri</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i>	LMG 941
GCA_000285775.1	<i>X. citri</i> pv. <i>punicae</i>	LMG 859
GCA_001497855.1	<i>X. citri</i> pv. <i>bilvae</i>	NCPFB 3213
GCA_007567665.1	<i>X. citri</i> pv. <i>glycines</i>	8ra
GCA_002224525.1	<i>X. citri</i> pv. <i>malvacearum</i>	XcmH1005

Table 3. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Description	Source
<i>X. citri</i> pv. <i>viticola</i>		
CCRMXCV17	Brazilian strain isolated from grapes	LAFIBAC ^a
CCRMXCV17 Δ rpfC	A <i>ΔrpfC</i> derivative of CCRMXCV17	This study
CCRMXCV17 Δ rpfF	A <i>ΔrpfF</i> derivative of CCRMXCV17	This study
CCRMXCV17 Δ hrcC	A <i>ΔhrcC</i> derivative of CCRMXCV17	This study
CCRMXCV17 Δ hrcC	A <i>ΔhrcC</i> derivative of CCRMXCV17	This study
Plasmids		
HB101	A <i>recA</i> strain carrying the helper plasmid	[69]
(pRK2013::Tn7)	pRK2013::Tn7	
pSC-A-amp/kan	A blunt-ended PCR cloning vector; f1 <i>ori</i> , pUC <i>ori</i> , <i>lacZ'</i> , Km ^R , Amp ^R	(Agilent Technologies, California, USA)
pKNOCK-Gm	A suicide vector; R6K γ - <i>ori</i> , RP4 <i>oriT</i> , Gm ^R	[70]

^aLaboratory of Plant Bacteriology from the Agronomy Department of the Federal Rural University of Pernambuco, Brazil.

FIGURES

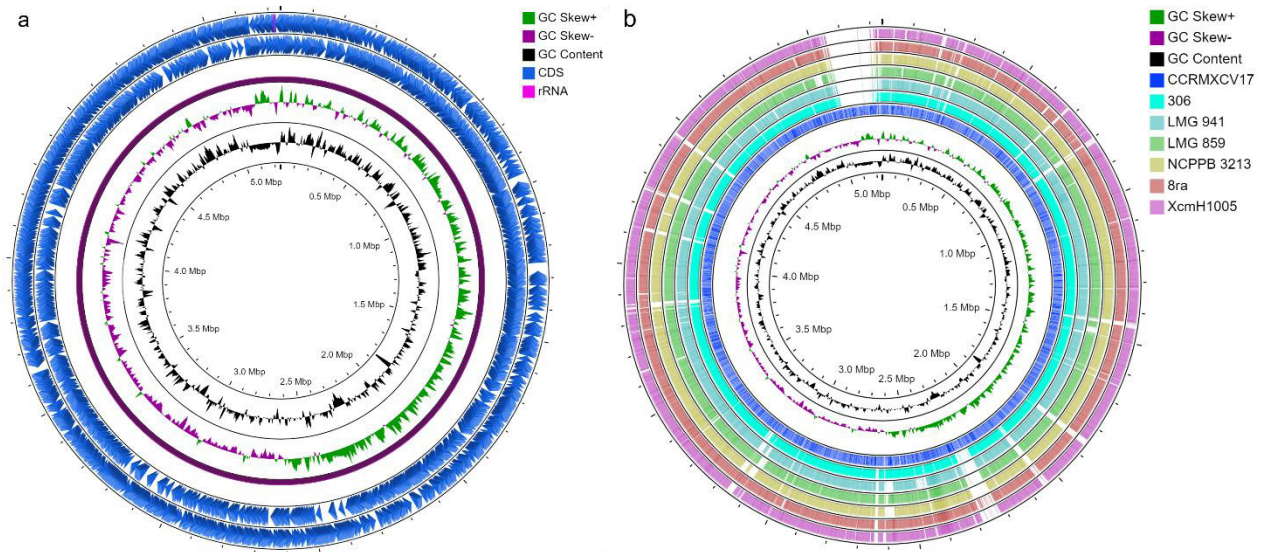


Fig. 1 The circular maps of the genome of *Xanthomonas citri* pv. *viticola* strain CCRMXCV17. (a) The circles from outer to inner represent the genome size: forward and reverse CDS, CCRMXCV17 genome, GC skew (green represents a region with G content greater than C, purple represents a region with C content greater than G), GC ratio (black, outward means GC ratio of the region is higher than average GC ratio; black, inward means GC ratio of the region is lower than average GC ratio). (b) Blast alignment of the CDS from the genome of different *X. citri* pathovars. Alterations in color intensity mean different levels of identity.

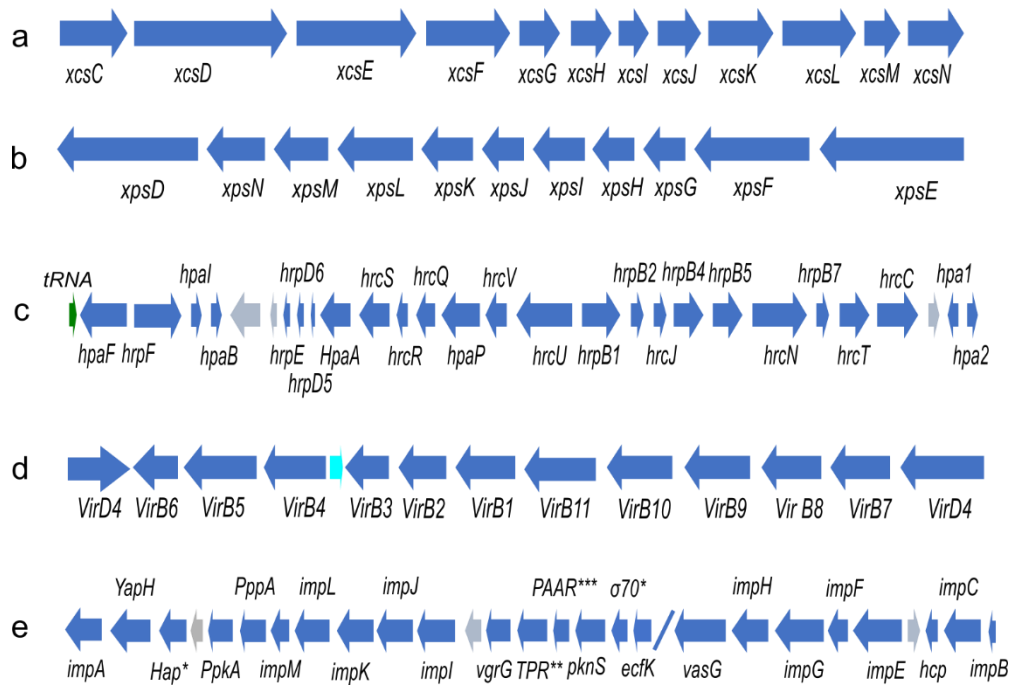


Fig. 2 Schematic representation of the main secretion systems of *Xanthomonas citri* pv. *viticola* strain CCRMXCV17. (a) and (b) T2SS *xcs* and *xps* clusters, respectively; (c) T3SS; (d) T4SS, and (e) T6SS. Gray color represents Hypothetical proteins and blue, repetitive regions. *Hap - Hemolysin activator protein. **PAAR - T6SS PAAR-repeat protein. *** σ 70 - sigma-70 Family RNA polymerase sigma factor. Drawing is not in scale.

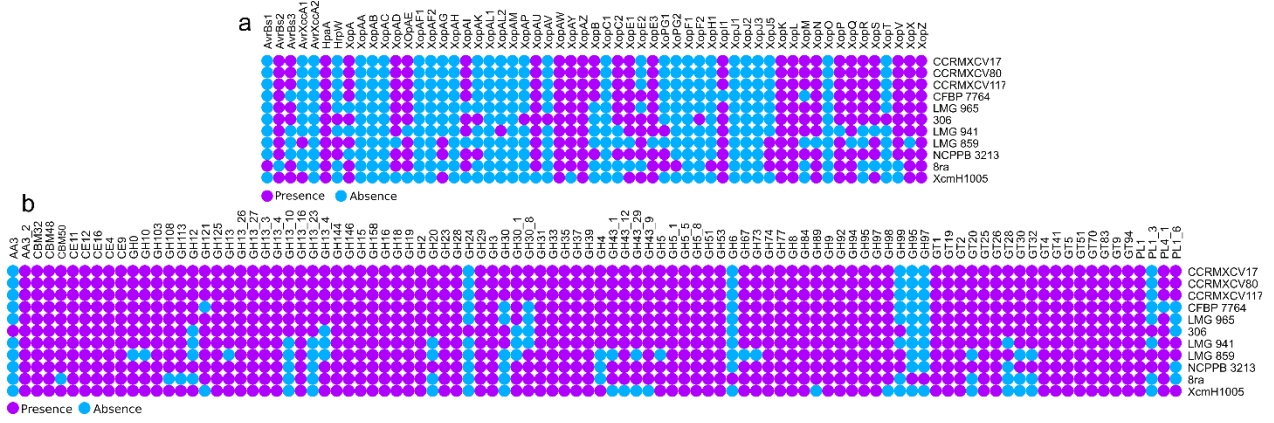


Fig. 3 Heat map representing the comparative (a) T3E and (b) CAZymes between the genomes of *Xanthomonas citri* pv. *viticola* pathovars. Different colors denote the presence or absence of the characteristic.

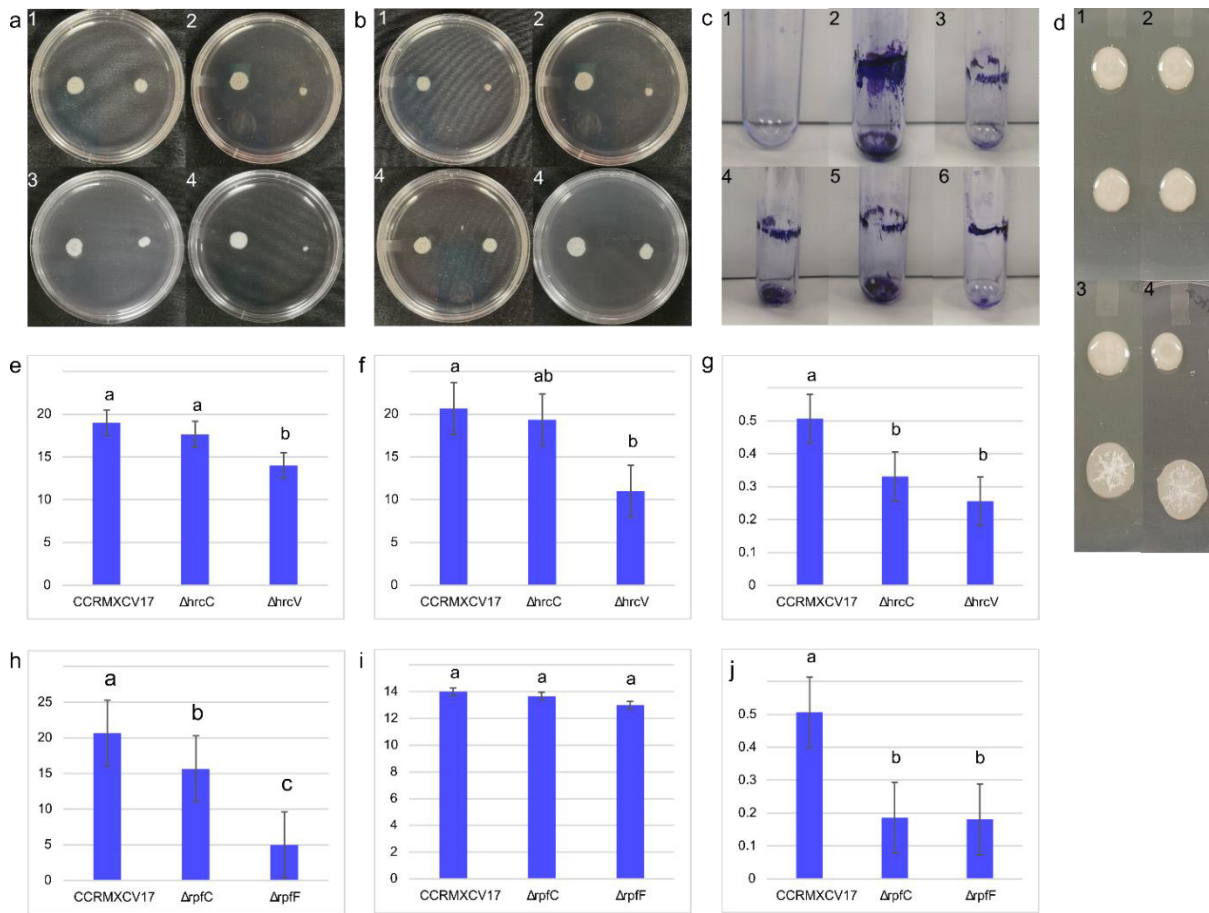


Fig. 4 *In vitro* test for the *Xanthomonas citri* pv. *viticola* strain CCRMXCV17T3SS and quorum sensing mutants. (a) and (b) Swimming and Swarming test: (1 and 2) $\Delta hrcC$ and $\Delta hrcV$ and (3 and 4), $\Delta rpfC$ and $\Delta rpfF$ mutants, respectively; (e, f, h, and i), statistical analysis for the respective strains. Different letters represent statistical significance (Test Tukey, $p < 0,05$). (c) The ability of biofilm formation of the strains: (1) negative control, (2) CCRMXCV17, (3) $\Delta hrcC$, (4) $\Delta hrcV$, (5) $\Delta rpfC$, (6) $\Delta rpfF$, and (g and j) statistical analysis for the respective strains. Different letters represent statistical significance (Test Tukey, $p < 0,05$). (d) EPS production: (1) $\Delta hrcC$, (2) $\Delta hrcV$, (3) $\Delta rpfC$, and (4) $\Delta rpfF$. The top colony represents the wild-type CCRMXCV17 and the bottom, the respective mutants.

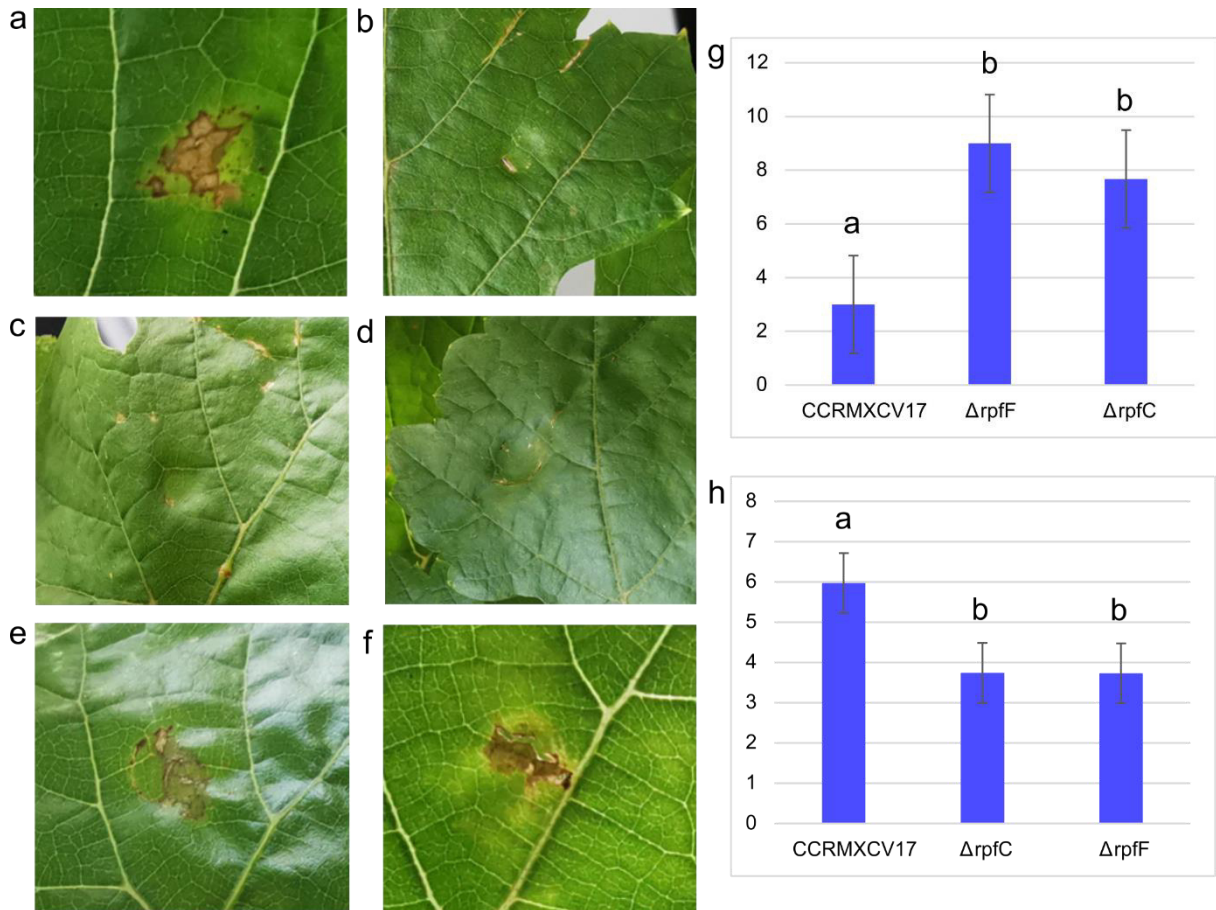
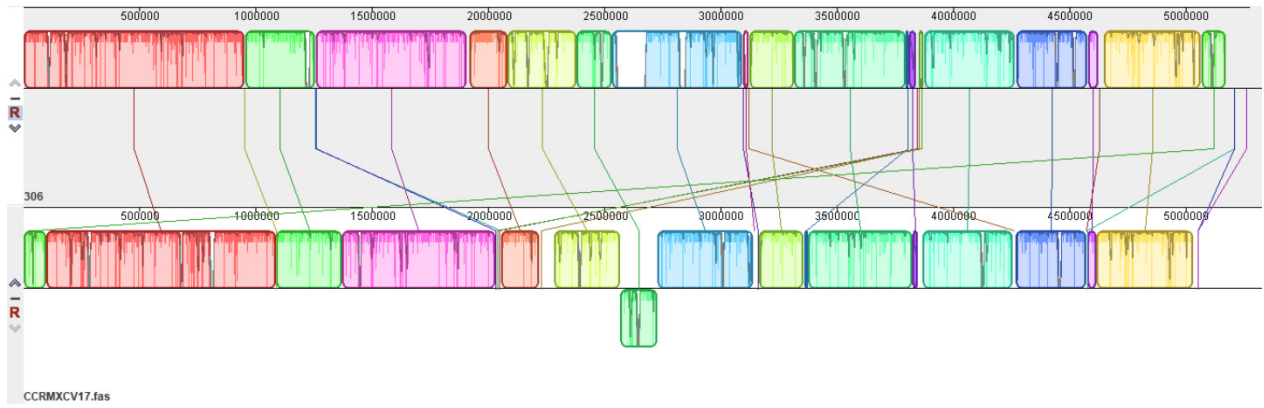
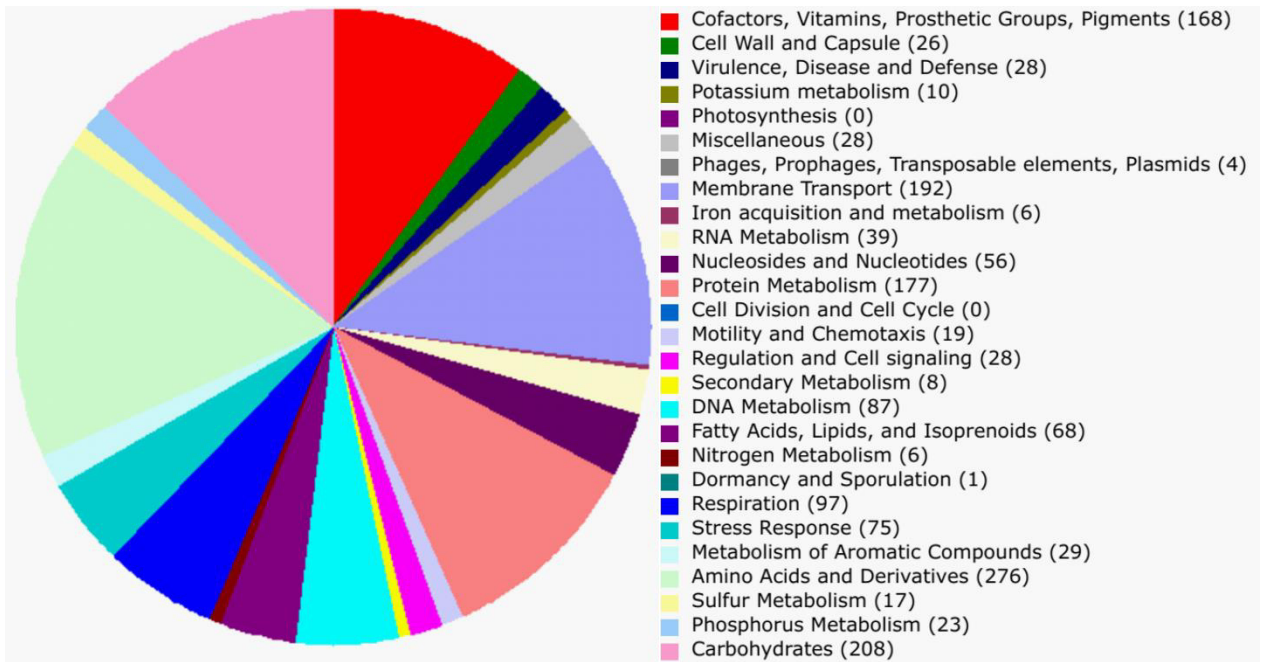


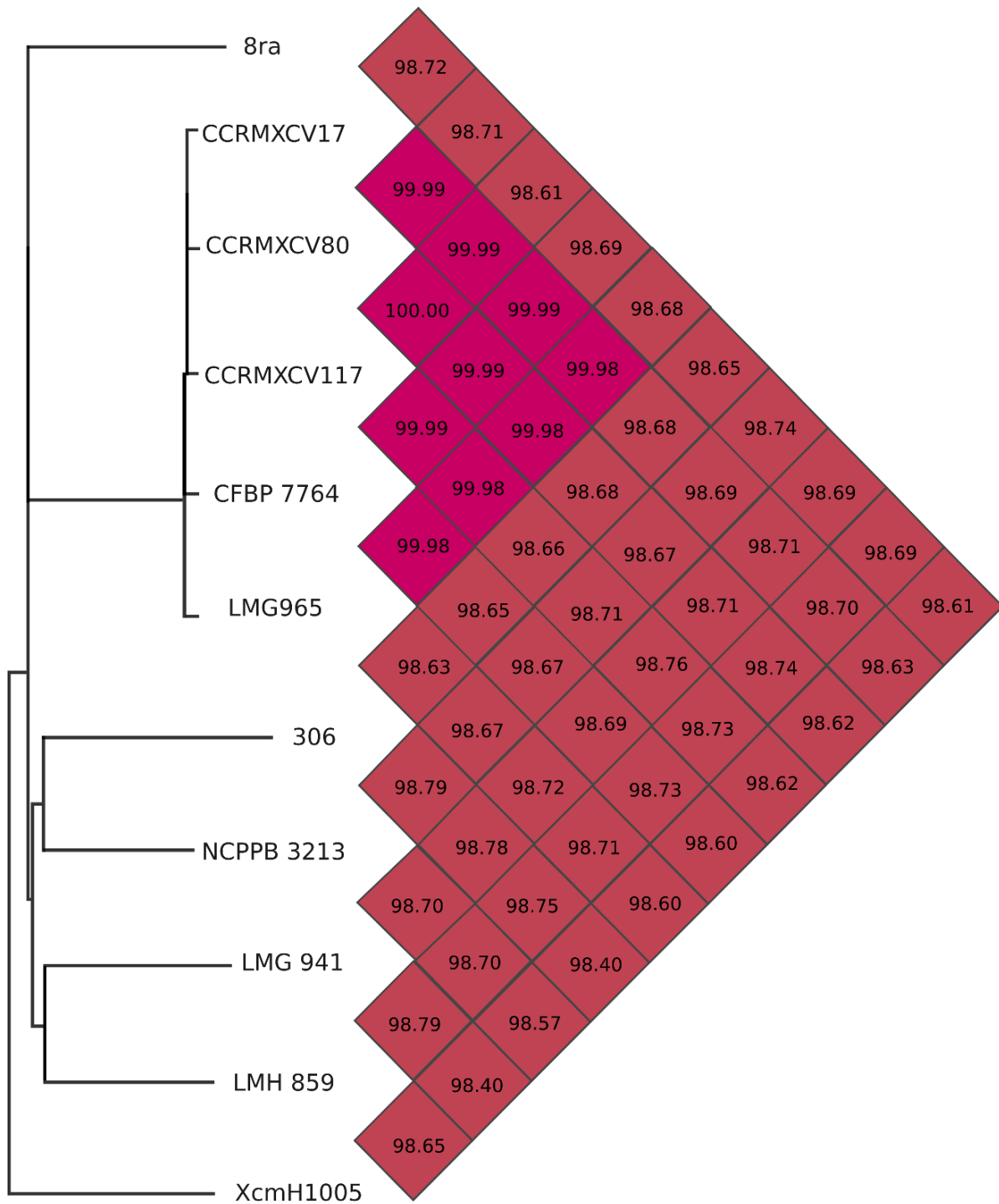
Fig. 5 Pathogenicity test of the wild-type and mutant strains of *Xanthomonas citri* pv. *viticola* strain CCRMXCV17 in grapes seedlings. (a) wild type strain CCRMXCV17, (b) Negative control (0 mol/l $MgSO_4$) (c) $\Delta hrnC$, (d) $\Delta hrnC$, (e) $\Delta rpfC$ (f) $\Delta rpfF$. Necrotic symptom with a yellow halo caused by the inoculation with the wild-type strain CCRMXCV17 and the mutants $\Delta rpfC$ and $\Delta rpfF$ and, the absence of symptom in the negative control, $\Delta hrnC$ and, $\Delta hrnC$ strains (g) and (h) Graphic representation of the statistical analysis for the incubation period and severity for the $\Delta rpfC$ and $\Delta rpfF$ mutants. Different letters represent statistical significance (Test Tukey, $p < 0.05$).



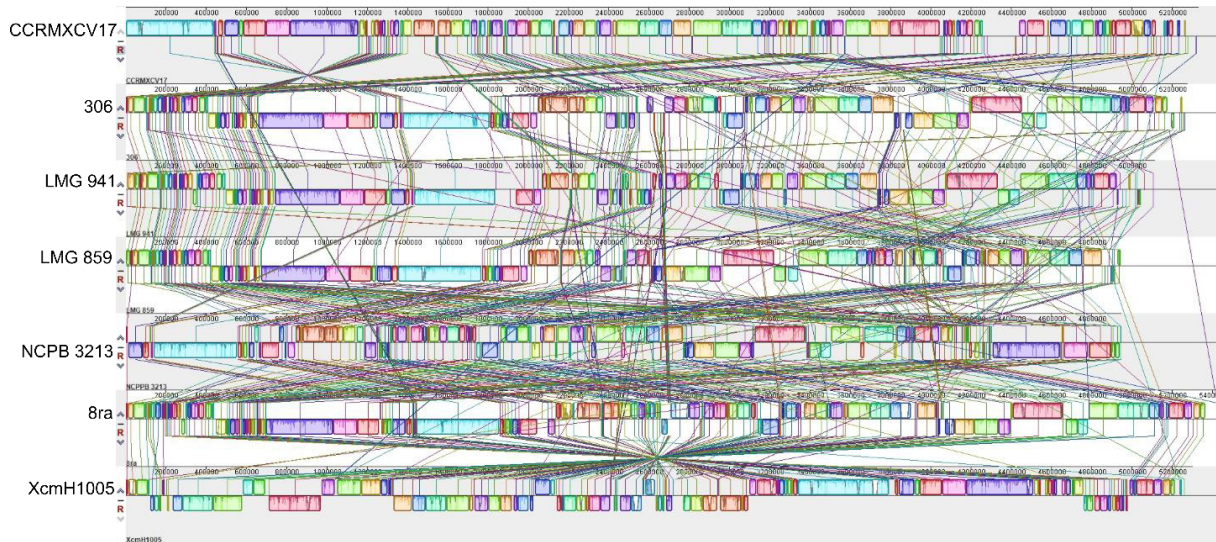
Additional file 1: Figure S1: MAUVE alignment of the CCRMXCV17 genome sequence of *Xanthomonas citri* pv. *viticola* with the reference *Xanthomonas citri* pv. *citri* strain 306. The colored blocks represent collinear sequence blocks shared by the genomes. Blocks drawn below the horizontal line indicate sequences found in an inverted orientation.



Additional file 2: Subsystems classes of the annotated CDS from the CCRMXC17 genomes annotated by the RAST pipeline.



Additional file 3: Figure S3. Average Nucleotide Identity (ANI) of the *Xanthomonas citri* pathovars genomes used for comparison in this study.



Additional file 4: Figure S4. MAUVE alignment of the CCRMXCV17 genome sequence with the *Xanthomonas citri* pathovars used for comparison in this study. The colored blocks represent collinear sequence blocks shared by the genomes. Blocks drawn below the horizontal line indicate sequences found in an inverted orientation. The connecting lines represent the genome, the transversions, and inversions between the genome sequences.

Additional file 5: Identification of the of the pathogenicity and virulence factors for *Xanthomonas citri* pv. *viticola*. Each following table represents one functional group of features. “1” - denotes presence and “0” - denotes absence.

Cell-wall degrading enzymes

Accession	Gene or locus_tag	Assigned Function	Pathovars*										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
AAM38359.1	XAC3516	cellulase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM39345.1	egl	cellulase	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
AAM39346.1	egl	cellulase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAM39347.1	egl	cellulase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM40389.1	bglX	periplasmic beta-glucosidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAM40548.1	bglX	beta-glucosidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAM40701.1	bglS	beta-glucosidase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM41043.1	XCC1752	cellulase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM41065.1	celD	glucan 1,4-beta-glucosidase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM41665.1	egl2	cellulase	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
AAM42164.1	XCC2892	glucan 1,4-beta-glucosidase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM42430.1	XCC3160	1,4-beta-cellobiosidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
AAM42650.1	XCC3380	cellulase S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAM42651.1	celS	cellulase S	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
AAM42791.1	engXCA	cellulase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
AAM42804.1	XCC3534	1,4-beta-cellobiosidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAM42805.1	XCC3535	cellulase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAM43327.1	XCC4106	glucan 1,4-beta-glucosidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAM43488.1	bglX	beta-glucosidase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM39087.1	xynB	xylanase	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0
AAM39089.1	xynB	xylanase	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
AAM39463.1	xynB	xylanase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM39468.1	XCC0149	xylosidase/arabinosidase	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
AAM40172.1	xynB	xylanase	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

*1-5 - *X. citri* pv. *viticola* (CCRMXCV17, CCRMXCV80, CCRMXCV117, CFBP 7764, and LMG 965, respectively); 6 - *X. citri* pv. *citri* 306; 7 - *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* LMG 941; 8 - *X. citri* pv. *punicae* LMG 859; 9 - *X. citri* pv. *bilvae* NCPFB 3213; 10 - *X. citri* pv. *glycines* 8ra; 11 - *X. citri* pv. *malvacearum* XcmH1005.

Cell-wall degrading enzymes, Continued

Accession	Gene or locus_tag	Assigned Function	Pathovars*											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
AAM40476.1	xyIB	xylosidase/arabinosidase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
AAM41046.1	xyIS	alpha-xylosidase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM41676.1	xsa	xylosidase/arabinosidase	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
AAM42309.1	xynB	xylanase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAM43196.1	xynB	beta-xylosidase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
AAM43285.1	XCC4064	xylosidase	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0
AAM43326.1	xyIB	xylosidase/arabinosidase	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
AAM43336.1	xynA	endo-1,4-beta-xylanase A	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
AAM43343.1	xsa	xylosidase/arabinosidase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM37225.1	pel	degenerated pectate lyase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
AAM38348.1	rhgB	rhamnogalacturonase B	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM39440.1	XCC0121	pectin methylesterase-like protein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAM39441.1	XCC0122	pectate lyase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
AAM39473.1	XCC0154	rhamnogalacturonan acetyesterase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
AAM39960.1	pel	pectate lyase	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
AAM39961.1	pel	pectate lyase	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
AAM41544.1	XCC2265	pectinesterase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAM41545.1	pglA	polygalacturonase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
AAM42087.1	pelB	pectate lyase II	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0
AAM42729.1	peh-1	endopolygalacturonase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AEL05713.1	XCR_0796	pectate lyase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CAJ23955.1	XCV2278	Pectate lyase precursor	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0

Methyl-Accepting Chemotaxis Proteins

Accession	Gene or locus_tag	Assigned Function	Pathovars*										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
AAW76094.1	tsr	chemotaxis protein	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0
AAM38611.1	XAC3768	chemotaxis protein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAM39643.1	tsr	chemotaxis protein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAM39595.1	tsr	chemotaxis protein	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
CAJ22300.1	XCV0669	methyl-accepting chemotaxis protein	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
CAJ23379.1	XCV1702	methyl-accepting chemotaxis protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CAJ23455.1	XCV1778	putative methyl-accepting chemotaxis protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CAJ23610.1	XCV1933	methyl-accepting chemotaxis protein	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
CAJ23615.1	XCV1938	methyl-accepting chemotaxis protein	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
CAJ23616.1	XCV1939	methyl-accepting chemotaxis protein	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
CAJ23617.1	XCV1940	methyl-accepting chemotaxis protein	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
CAJ23618.1	XCV1941	methyl-accepting chemotaxis protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CAJ23619.1	XCV1942	methyl-accepting chemotaxis protein	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
CAJ23622.1	XCV1945	methyl-accepting chemotaxis protein	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
CAJ23624.1	XCV1947	methyl-accepting chemotaxis protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

*1-5 - *X. citri* pv. *viticola* (CCRMXCV17, CCRMXCV80, CCRMXCV117, CFBP 7764, and LMG 965, respectively); 6 - *X. citri* pv. *citri* 306; 7 - *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* LMG 941; 8 - *X. citri* pv. *punicae* LMG 859; 9 - *X. citri* pv. *bilvae* NCPPB 3213; 10 - *X. citri* pv. *glycines* 8ra; 11 - *X. citri* pv. *malvacearum* XcmH1005.

Two-component regulatory system

Accession	Gene or locus_tag	Assigned Function	Pathovars*											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
AAM35027.1	XAC0135	two-component system sensor protein	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
AAM35028.1	XAC0136	two-component system regulatory protein	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
AAM35099.1	ntrB	two-component system sensor protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM35117.1	XAC0225	two-component system sensor protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM35218.1	smeS	two-component system sensor protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM35383.1	XAC0494	two-component system sensor protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM35499.1	XAC0610	histidine kinase-response regulator hybrid protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM35509.1	algZ	two-component system sensor protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM35572.1	XAC0683	two-component system sensor protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM35574.1	XAC0685	histidine kinase-response regulator hybrid protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM35618.1	XAC0729	two-component system sensor protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM35648.1	kdpD	two-component system sensor protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
AAM35723.1	colS	two-component system sensor protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
AAM35785.1	torS	two-component system sensor protein	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
AAM35924.1	phoR	two-component system sensor protein	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM35953.1	XAC1074	sensor histidine kinase	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAM35954.1	XAC1075	sensor histidine kinase	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1

*1-5 - *X. citri* pv. *viticola* (CCRMXCV17, CCRMXCV80, CCRMXCV117, CFBP 7764, and LMG 965, respectively); 6 - *X. citri* pv. *citri* 306; 7 - *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* LMG 941; 8 - *X. citri* pv. *punicae* LMG 859; 9 - *X. citri* pv. *bilvae* NCPPB 3213; 10 - *X. citri* pv. *glycines* 8ra; 11 - *X. citri* pv. *malvacearum* XcmH1005.

TonB-Dependent Outer Membrane Transporters

Accession	Gene or locus_tag	Assigned Function	Pathovars*										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
AAM35183.1	oar	Oar protein	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
AAM35740.1	XAC0852	TonB-dependent receptor	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
AAM37038.1	fhuA	ferrichrome-iron receptor	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AAM37046.1	cirA	TonB-dependent receptor	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AAM37895.1	btuB	TonB-dependent receptor	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1
AAM37922.1	cirA	TonB-dependent receptor	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
AAM38045.1	fyuA	TonB-dependent receptor	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
AAM38341.1	fhuE	outer membrane receptor for ferric iron uptake	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
AAM38456.1	btuB	TonB-dependent receptor	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
AAM38463.1	pfeA	siderophore receptor protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM38897.1	fhuA	TonB-dependent receptor	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM42139.1	btuB	TonB-dependent receptor	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
AAM39439.1	iroN	TonB-dependent receptor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAM39624.1	fhuA	TonB-dependent receptor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAM39712.1	fhuA	TonB-dependent receptor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAM39715.1	bfeA	TonB-dependent receptor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAM40638.1	btuB	TonB-dependent receptor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*1-5 - *X. citri* pv. *viticola* (CCRMXCV17, CCRMXCV80, CCRMXCV117, CFBP 7764, and LMG 965, respectively); 6 - *X. citri* pv. *citri* 306; 7 - *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* LMG 941; 8 - *X. citri* pv. *punicae* LMG 859; 9 - *X. citri* pv. *bilvae* NCPPB 3213; 10 - *X. citri* pv. *glycines* 8ra; 11 - *X. citri* pv. *malvacearum* XcmH1005.

TonB-Dependent Outer Membrane Transporters Continued.

Accession	Gene or locus_tag	Assigned Function	Pathovars*											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
AAM41335.1	fecA	TonB-dependent receptor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAM39623.1	XCC0304	TonB-dependent receptor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAM41013.1	XCC1719	TonB-dependent receptor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAM42788.1	fpvA	ferripyoverdine receptor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAM42865.1	pbuA	ferric pseudobactin M4 receptor protein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAM42905.1	XCC3635	conserved hypothetical protein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAM43273.1	fecA	TonB-dependent receptor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAM43378.1	XCC4162	ferrichrome-iron receptor 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAM43453.1	oar	Oar protein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAW76083.1	FhuE	Outer membrane receptor for ferric coprogen and ferric-rhodotorulic acid	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CAJ24918.1	XCV3187	TonB-dependent outer membrane receptor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*1-5 - *X. citri* pv. *viticola* (CCRMXCV17, CCRMXCV80, CCRMXCV117, CFBP 7764, and LMG 965, respectively); 6 - *X. citri* pv. *citri* 306; 7 - *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* LMG 941; 8 - *X. citri* pv. *punicae* LMG 859; 9 - *X. citri* pv. *bilvae* NCPPB 3213; 10 - *X. citri* pv. *glycines* 8ra; 11 - *X. citri* pv. *malvacearum* XcmH1005.

Nonfimbrial adhesins

Accession	Gene or locus_tag	Assigned Function	Pathovars*										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
AAM37004	yapH	YapH protein	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1
AAW73935	xadA	outer membrane protein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAW74096	xadA	outer membrane protein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CAJ23493	panB	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
CAJ23537	fhaB1	filamentous hemagglutinin-related protein	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0
CAJ23538	fhaB2	filamentous hemagglutinin-related protein	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0
CAJ25401	xadA1	Xanthomonas adhesin XadA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CAJ25403	xadA2	Xanthomonas adhesin XadA	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0
CAJ25934	yapH	filamentous hemagglutinin-related protein	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0
CAJ26175	XCV4444	putative hemagglutinin-related protein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*1-5 - *X. citri* pv. *viticola* (CCRMXCV17, CCRMXCV80, CCRMXCV117, CFBP 7764, and LMG 965, respectively); 6 - *X. citri* pv. *citri* 306; 7 - *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* LMG 941; 8 - *X. citri* pv. *punicae* LMG 859; 9 - *X. citri* pv. *bilvae* NCPPB 3213; 10 - *X. citri* pv. *glycines* 8ra; 11 - *X. citri* pv. *malvacearum* XcmH1005.

Type IV pili and fimbriae

Accession	Gene or locus_tag	Assigned Function	Pathovars*										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
AAM35150.1	XAC0259	conserved hypothetical protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM35151.1	XAC0258	conserved hypothetical protein	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1
AAM36006.1	pilZ	type IV fimbriae assembly protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM36879.1	pilF	fimbrial biogenesis protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM37250.1	fimX	conserved hypothetical protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM37511.1	pilE	PilE protein	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0
AAM37512.1	pilY1	PilY1 protein	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0
AAM37513.1	PilX	PilX protein	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0
AAM37514.1	XAC2667 (PilW)	conserved hypothetical protein	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
AAM37515.1	pilV	pre-pilin leader sequence	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
AAM37516.1	fimT	pre-pilin like leader sequence	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
AAM37768.1	pilU	twitching motility protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM37769.1	pilT	twitching motility protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM37943.1	PilL	PilL protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM37944.1	pilJ	pilus biogenesis protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM37945.1	pilI	pilus biogenesis protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM37946.1	pilH	PilH protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

*1-5 - *X. citri* pv. *viticola* (CCRMXCV17, CCRMXCV80, CCRMXCV117, CFBP 7764, and LMG 965, respectively); 6 - *X. citri* pv. *citri* 306; 7 - *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* LMG 941; 8 - *X. citri* pv. *punicae* LMG 859; 9 - *X. citri* pv. *bilvae* NCPPB 3213; 10 - *X. citri* pv. *glycines* 8ra; 11 - *X. citri* pv. *malvacearum* XcmH1005.

Type IV pili and fimbriae

Accession	Gene or locus_tag	Assigned Function	Pathovars*											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
AAM38224.1	pilQ	fimbrial assembly protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM38225.1	pilP	fimbrial assembly protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM38226.1	pilO	fimbrial assembly membrane protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM38227.1	pilN	fimbrial assembly membrane protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM38228.1	pilM	fimbrial assembly membrane protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM38647.1	pilA	fimbrial protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1

*1-5 - *X. citri* pv. *viticola* (CCRMXCV17, CCRMXCV80, CCRMXCV117, CFBP 7764, and LMG 965, respectively); 6 - *X. citri* pv. *citri* 306; 7 - *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* LMG 941; 8 - *X. citri* pv. *punicae* LMG 859; 9 - *X. citri* pv. *bilvae* NCPPB 3213; 10 - *X. citri* pv. *glycines* 8ra; 11 - *X. citri* pv. *malvacearum* XcmH1005.

Extracellular Exopolysaccharides

Accession	Gene or locus_tag	Assigned Function	Pathovars*											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
AAM41731.1	GumB	GumB protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM41730.1	GumC	GumC protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM41729.1	GumD	GumD protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM41728.1	GumE	GumE protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM41727.1	GumF	GumF protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM41726.1	GumG	GumG protein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAM41725.1	GumH	GumH protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM41724.1	GumI	GumI protei	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM41723.1	GumJ	GumJ protei	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM41722.1	GumK	GumK protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM41721.1	GumL	GumL protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM41720.1	GumM	GumM protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM37422.1	GumN	GumN protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

*1-5 - *X. citri* pv. *viticola* (CCRMXCV17, CCRMXCV80, CCRMXCV117, CFBP 7764, and LMG 965, respectively); 6 - *X. citri* pv. *citri* 306; 7 - *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* LMG 941; 8 - *X. citri* pv. *punicae* LMG 859; 9 - *X. citri* pv. *bilvae* NCPPB 3213; 10 - *X. citri* pv. *glycines* 8ra; 11 - *X. citri* pv. *malvacearum* XcmH1005.

Lipopolysaccharides

Accession	Gene or locus_tag	Assigned Function	Pathovars*											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
AAM38429.1	etfB	electron transfer flavoprotein beta subunit	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM38430.1	etfA	electron transfer flavoprotein alpha subunit	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM38431.1	XAC3588	integral membrane protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
AAM38432.1	XAC3589	integral membrane protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
AAM38433.1	XAC3590	oxidoreductase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
AAM38434.1	XAC3591	short chain dehydrogenase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
AAM38435.1	XAC3592	hypothetical protein	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
AAM38436.1	XAC3593	NAD dependent epimerase/dehydratase/dehydrogenase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
AAM38437.1	XAC3594	phytoene desaturase	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0
AAM38438.1	XAC3595	hypothetical protein	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0
AAM38439.1	XAC3596	hypothetical protein	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
AAM38440.1	XAC3597	hypothetical protein	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0
AAM38441.1	rfbC	truncated O-antigen biosynthesis protein	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0
AAM38442.1	XAC3599	hypothetical protein	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
AAM38443.1	wzt	ABC transporter ATP-binding protein	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0
AAM38444.1	wzm	ABC transporter permease	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0
AAM38445.1	metB	cystathionine gamma-lyase-like protein	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1

*1-5 - *X. citri* pv. *viticola* (CCRMXCV17, CCRMXCV80, CCRMXCV117, CFBP 7764, and LMG 965, respectively); 6 - *X. citri* pv. *citri* 306; 7 - *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* LMG 941; 8 - *X. citri* pv. *punicae* LMG 859; 9 - *X. citri* pv. *bilvae* NCPPB 3213; 10 - *X. citri* pv. *glycines* 8ra; 11 - *X. citri* pv. *malvacearum* XcmH1005.

Chemotactic proteins

Accession	Gene or locus_tag	Assigned Function	Pathovars*											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
AAM38573.1	cheR	methylesterase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM37715.1	cheB	protein-glutamate methylesterase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM37714.1	cheR	response regulator for chemotaxis	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM37712.1	cheW	chemotaxis protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM37710.1	cheA	chemotaxis histidine protein kinase	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
AAM37298.1	cheW	chemotaxis protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM36849.1	cheV	chemotaxis protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM36793.1	cheZ	chemotaxis related protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM36792.1	cheA	chemotaxis related protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM36768.1	cheW	chemotaxis protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM36765.1	cheA	chemotaxis protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM36751.1	cheD	chemotaxis protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM36750.1	cheB	glutamate methylesterase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM36152.1	cheR	chemotaxis protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM36151.1	cheB	protein-glutamate methylesterase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM41194.1	cheY	chemotaxis protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CAJ23612.1	cheW1	chemotaxis signal transduction protein	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
CAJ23609.1	cheR2	methylase of chemotaxis methyl-accepting proteins	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1

*1-5 - *X. citri* pv. *viticola* (CCRMXCV17, CCRMXCV80, CCRMXCV117, CFBP 7764, and LMG 965, respectively); 6 - *X. citri* pv. *citri* 306; 7 - *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* LMG 941; 8 - *X. citri* pv. *punicae* LMG 859; 9 - *X. citri* pv. *bilvae* NCPPB 3213; 10 - *X. citri* pv. *glycines* 8ra; 11 - *X. citri* pv. *malvacearum* XcmH1005.

Flagellar proteins

Accession	Gene or locus_tag	Assigned Function	Pathovars*											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
AAM36770.1	motB	MotB protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM36771.1	motA	MotA protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM36798.1	flhA	flagellar protein	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
AAM36799.1	flhB	flagellar protein	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
AAM36803.1	fliR	flagellar biosynthetic protein	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
AAM36804.1	fliQ	flagellar biosynthesis	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
AAM36806.1	fliP	flagellar biosynthetic protein	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
AAM36807.1	fliO	flagellar protein	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
AAM36809.1	fliM	flagellar protein	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
AAM36812.1	fliJ	flagellar FliJ protein	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
AAM36813.1	fliI	flagellar protein	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
AAM36814.1	fliH	flagellar protein	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
AAM36815.1	fliG	flagellar protein	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
AAM36816.1	fliF	flagellar protein	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
AAM36817.1	fliE	flagellar protein	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
AAM36835.1	fliS	flagellar protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

*1-5 - *X. citri* pv. *viticola* (CCRMXCV17, CCRMXCV80, CCRMXCV117, CFBP 7764, and LMG 965, respectively); 6 - *X. citri* pv. *citri* 306; 7 - *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* LMG 941; 8 - *X. citri* pv. *punicae* LMG 859; 9 - *X. citri* pv. *bilvae* NCPPB 3213; 10 - *X. citri* pv. *glycines* 8ra; 11 - *X. citri* pv. *malvacearum* XcmH1005.

Quorum sensing

Accession	Gene or locus_tag	Assigned Function	Pathovars*											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
AAM35374.1	clp	CAP-like protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM36736.1	rpfD	regulatory protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
AAM36740.1	RpfC	RpfC protein	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1
AAM36741.1	RpfF	RpfF protein	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1
AAM41134.1	rpfE	regulatory protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM41136.1	rpfI	regulatory protein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAM41143.1	rpfG	response regulator	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM41147.1	rpfB	RpfB protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM41149.1	rpfA	aconitase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM41957.1	TR fur family	transcriptional regulator fur family	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAM43235.1	rapK	pteridine-dependent deoxygenase like protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

*1-5 - *X. citri* pv. *viticola* (CCRMXCV17, CCRMXCV80, CCRMXCV117, CFBP 7764, and LMG 965, respectively); 6 - *X. citri* pv. *citri* 306; 7 - *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* LMG 941; 8 - *X. citri* pv. *punicae* LMG 859; 9 - *X. citri* pv. *bilvae* NCPPB 3213; 10 - *X. citri* pv. *glycines* 8ra; 11 - *X. citri* pv. *malvacearum* XcmH1005.

Additional file 6: Characterization of the secretion systems for *Xanthomonas citri* pv. *viticola* strain CCRMXCV17. Each following table represents one secretion system.

Type I secretion system

Gene	RAST annotation code	NCBI best hit	Identity (%)
hlyD	fig 66666666.588398.peg.4155	CDN20282.1	100
hlyB	fig 66666666.588398.peg.4156	WP_033485083.1	100
tolC	fig 66666666.588398.peg.4114	WP_007967744.1	100
Ax21	fig 66666666.588398.peg.4539	AEO40518.1	100
raxC	fig 66666666.588398.peg.4114	AEO43602.1	99.348
raxB	fig 66666666.588398.peg.1995	AEO41474.1	37.369
raxST	fig 66666666.588398.peg.2575	AEO41473.1	30
raxA	fig 66666666.588398.peg.1996	ACD57929.1	23.185

Type II secretion system: xcs cluster

Gene	RAST annotation code	NCBI best hit	Identity (%)
xcsC	fig 6666666.588398.peg.423	XAC0694	99.257
xcsD	fig 6666666.588398.peg.424	XAC0695	99.277
xcsE	fig 6666666.588398.peg.425	XAC0696	99.394
xcsF	fig 6666666.588398.peg.426	XAC0697	99.25
xcsG	fig 6666666.588398.peg.427	XAC0698	96.753
xcsH	fig 6666666.588398.peg.428	XAC0699	96.795
xcsI	fig 6666666.588398.peg.429	XAC0700	95.238
xcsJ	fig 6666666.588398.peg.430	XAC0701	99
xcsK	fig 6666666.588398.peg.431	XAC0702	100
xcsL	fig 6666666.588398.peg.432	XAC0703	98.895
xcsM	fig 6666666.588398.peg.433	XAC0704	96.835
xcsN	fig 6666666.588398.peg.434	XAC0705	99.58

Type II secretion system: xps cluster

Gene	RAST annotation code	NCBI best hit	Identity (%)
xpsE	fig 6666666.588398.peg.3641	XAC4212	99.657
xpsD	fig 6666666.588398.peg.4198	XAC3534	98.16
xpsN	fig 6666666.588398.peg.4199	XAC3535	98.86
xpsM	fig 6666666.588398.peg.4200	XAC3536	99.539
xpsL	fig 6666666.588398.peg.4201	XAC3537	99.464
xpsK	fig 6666666.588398.peg.4202	XAC3538	99.647
xpsJ	fig 6666666.588398.peg.4203	XAC3539	99.526
xpsI	fig 6666666.588398.peg.4204	XAC3540	97.826
xpsH	fig 6666666.588398.peg.4205	XAC3541	100
xpsG	fig 6666666.588398.peg.4206	XAC3542	99.301
xpsF	fig 6666666.588398.peg.4207	XAC3543	100
xpsE	fig 6666666.588398.peg.4208	XAC3544	99.623

Type III secretion system

Gene	RAST annotation code	NCBI best hit	Identity (%)
HpaF	fig 6666666.588398.peg.60	XAC0393	93.39
HrpF	fig 6666666.588398.peg.61	XAC0394	97.76
HpaI	fig 6666666.588398.peg.62	XVT_3476	100
putative uncharacterized protein	fig 6666666.588398.peg.63	XAPC_1893	95.27
hypothetical protein	fig 6666666.588398.peg.64	XAR_4140	98.53
HpaB	fig 6666666.588398.peg.65	XAC0402	99.36
HrpE	fig 6666666.588398.peg.66	XAC0397	91.398
HrpD6	fig 6666666.588398.peg.67	XAC0398	98.75
HrpD5	fig 6666666.588398.peg.68	XAC0399	99.679
HpaA	fig 6666666.588398.peg.69	XAC0400	98.524
HrcS	fig 6666666.588398.peg.70	XAC0401	100
HrcR	fig 6666666.588398.peg.71	XAC0402	100
HrcQ	fig 6666666.588398.peg.72	XAC0403	98.684
HpaP	fig 6666666.588398.peg.73	XAC0404	97.549
HrcV	fig 6666666.588398.peg.74	XAC0405	99.845
HrcU	fig 6666666.588398.peg.75	XAC0406	98.599
HrpB1	fig 6666666.588398.peg.76	XAC0407	98.675
HrpB2	fig 6666666.588398.peg.77	XAC0408	99.231
HrcJ	fig 6666666.588398.peg.78	XAC0409	98.814
HrpB4	fig 6666666.588398.peg.79	XAC0410	99.522
HrpB5	fig 6666666.588398.peg.80	XAC0411	99.142
HrcN	fig 6666666.588398.peg.81	XAC0412	99.774
HrpB7	fig 6666666.588398.peg.82	XAC0413	98.817
HrcT	fig 6666666.588398.peg.83	XAC0414	99.638
HrcC	fig 6666666.588398.peg.84	XAC0415	99.835
conserved hypothetical protein	fig 6666666.588398.peg.85	XFF6992_50026	76
Hpa1	fig 6666666.588398.peg.86	XAC0416	99.27
Hpa2	fig 6666666.588398.peg.87	XAC0417	98.551

Type IV secretion system

Gene	RAST annotation code	NCBI best hit	Identity (%)
VirB6	fig 6666666.588398.peg.1572	XAC2612	96
virB6	fig 6666666.588398.peg.1575	XVT_2866	100
virD4	fig 6666666.588398.peg.1909	WP_033485468	100
TrbL/VirB6	fig 6666666.588398.peg.2614	WP_017155027	100
VirB5	fig 6666666.588398.peg.2615	CKU38_02718	94.6
virB4	fig 6666666.588398.peg.2616	WP_033485977	100
repeat sequence	fig 6666666.588398.repeat.17	-	-
VirB3	fig 6666666.588398.peg.2617	XAC2615	100
VirB2	fig 6666666.588398.peg.2618	XAC2616	100
VirB1	fig 6666666.588398.peg.2619	XAC2617	96.429
VirB11	fig 6666666.588398.peg.2620	XAC2618	100
VirB10	fig 6666666.588398.peg.2621	XAC2619	100
VirB9	fig 6666666.588398.peg.2622	XAC2620	100
VirB8	fig 6666666.588398.peg.2623	XAC2621	99.417
Chain A, VirB7	fig 6666666.588398.peg.2624	6GYB_A	100
VirD4	fig 6666666.588398.peg.2625	XAC2623	100
TrbL/VirB6	fig 6666666.588398.peg.3301	WP_033485978	98.89
TrbL/VirB6	fig 6666666.588398.peg.3962	WP_033485982	100
COG3704 Type IV secretory pathway, VirB6	fig 6666666.588398.peg.4469	XVT_2866	100
traH/COG3704 Type IV secretory pathway, VirB6 components	fig 6666666.588398.peg.4472	XVT_2866	100

Sec pathway

Gene	RAST annotation code	NCBI best hit	Identity (%)
SRP54	fig 66666666.588398.peg.1035	WP_005914684.1	100
ftsY	fig 66666666.588398.peg.1517	AAM37403.1	99.46
SecF	fig 66666666.588398.peg.1946	WP_003489762.1	100
SecD	fig 66666666.588398.peg.1947	WP_078515529.1	100
yajC	fig 66666666.588398.peg.1949	WP_003489768.1	100
secG	fig 66666666.588398.peg.2720	WP_005914281.1	100
yidC	fig 66666666.588398.peg.3758	WP_005912411.1	100
secB	fig 66666666.588398.peg.4537	WP_033484095.1	100
secA	fig 66666666.588398.peg.526	WP_005910880.1	100
secE	fig 66666666.588398.peg.715	WP_005917581.1	100
secY	fig 66666666.588398.peg.750 (454)	WP_003486674.1	100

Tat pathway

Gene	RAST annotation code	NCBI best hit	Identity (%)
tatA	fig 6666666.588398.peg.3649	WP_003484969	100
tatB	fig 6666666.588398.peg.3648	WP_033485810	100
tatC	fig 6666666.588398.peg.3647	WP_005923115	100

Type VI secretion system			
Gene	RAST annotation code	NCBI best hit	Identity (%)
impA	fig 6666666.588398.peg.3527	XAC4112	97.695
YapH	fig 6666666.588398.peg.3528	WP_098477537	100
Hemolysin activator protein	fig 6666666.588398.peg.3529	WP_033485570	100
hypothetical protein	fig 6666666.588398.peg.3530	WP_033485571	100
PpkA	fig 6666666.588398.peg.3531	WP_033485572	100
PppA	fig 6666666.588398.peg.3532	WP_003487360	100
impM (tagF)	fig 6666666.588398.peg.3533	WP_033485573	100
impL	fig 6666666.588398.peg.3534	XAC4119	99.319
impK	fig 6666666.588398.peg.3535	XAC4120	99.284
impJ	fig 6666666.588398.peg.3536	XAC4121	99.324
impI (TagH)	fig 6666666.588398.peg.3537	WP_011052746	100
hypothetical protein	fig 6666666.588398.peg.3538	WP_003487349	100
vgrG	fig 6666666.588398.peg.3539	XAC4124	99.542
FIG140336: TPR domain protein	fig 6666666.588398.peg.3540	WP_033485577	100
T6SS PAAR-repeat protein	fig 6666666.588398.peg.3541	WP_014091406	99.04
Serine/threonine kinase	fig 6666666.588398.peg.3542	XVT_3735	100
sigma-70 family RNA polymerase sigma factor	fig 6666666.588398.peg.3543	WP_003487343	100
RNA polymerase ECF- type sigma factor	fig 6666666.588398.peg.3544	WP_033485620	100
vasG	fig 6666666.588398.peg.3556	XAC4140	98.92
impH	fig 6666666.588398.peg.3557	XAC4141	99.701
impG	fig 6666666.588398.peg.3558	XAC4142	99.362
impF	fig 6666666.588398.peg.3559	XAC4143	98.802
impE	fig 6666666.588398.peg.3560	WP_033485584	100
hypothetical protein	fig 6666666.588398.peg.3561	WP_136614820	100
hcp	fig 6666666.588398.peg.3562	XAC4145	99.401
impC	fig 6666666.588398.peg.3563	XAC4146	99.799
impB	fig 6666666.588398.peg.3564	XAC4147	98.817

Additional file S7 Primers list used for fragment amplification of the genes *rpfC*, *rpfFF*, *hrcC*, and *hrcV*.

Target	Primer name	Primer Sequence
Quorum sensing	rpfCF1	CAAGCTGCGCATCAACACTT
	rpfCR1	GGGTTTTTCCTCGAACCCGAT
Quorum sensing	rpfFF1	CGAACTGCTGGAAGAAATGTG
	rpfFR1	GTAGATGCGTCCTTCGAGAAT
T3SS	hrcCF1	CGAAGTGCAGGTGTTTCAGC
	hrcCR1	CTTGGGCCCGTTATCCAAC
T3SS	hrcVF1	CCATGGAAAGCCAACTGCAC
	hrcVR1	GCGAAATCAGGGGCGTTTTT

CONCLUSÕES GERAIS



CONCLUSÕES GERAIS

- Os genomas dos isolados CCRMXCV17, CCRMXCV80, CCRMXCV117, CFBP 7764 e LMG 965 de *X. citri* pv. *viticola* possuem elevada similaridade funcional, clusters de metabólitos secundários, ilhas gênicas, presença de elementos de inserção e profagos;
- Análises pangenômica e filogenômica de *X. citri* pv. *viticola* e patovares relacionados permitiram reforçar a recente proposta taxonômica da mudança de *X. campestris* pv. *viticola* para *X. citri* pv. *viticola*;
- Proteínas aceptoras de metil, sistemas dependentes de TonB, enzimas degradadoras da parede celular, efetores do sistema de secreção tipo III, proteína associadas a flagelina e componentes do pilus tipo IV, parecem ser os principais fatores relacionados a patogenicidade e virulência de *X. citri* pv. *viticola*;
- O sistema de secreção tipo III e *quorum sensing* são essenciais para a formação de biofilme e motilidade de *X. citri* pv. *viticola*, onde o primeiro parece ser essencial para a patogenicidade e o segundo para a virulência completa desta fitobactéria em *V. vinifera*.