



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL  
DE PERNAMBUCO**  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM FITOPATOLOGIA**

**Tese de Doutorado**

**Sensibilidade a cúpricos e estrutura genética de  
populações de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola***

**Elias Inácio da Silva**

**Recife - PE  
2017**

**ELIAS INÁCIO DA SILVA**

**SENSIBILIDADE A CÚPRICOS E ESTRUTURA GENÉTICA  
DE POPULAÇÕES DE *Xanthomonas campestris* pv. *viticola***

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:**

Profª Dra. Elineide Barbosa de Souza (UFRPE) - Orientadora

Profª Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano (UFRPE) – Coorientadora

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

**RECIFE - PE  
FEVEREIRO - 2017**

**SENSIBILIDADE A CÚPRICOS E ESTRUTURA GENÉTICA  
DE POPULAÇÕES DE *Xanthomonas campestris* pv. *viticola***

**ELIAS INÁCIO DA SILVA**

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 22/02/2017.

**ORIENTADORA:**

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Elineide Barbosa de Souza (UFRPE)

**EXAMINADORES:**

---

Dra. Viviane Jurema Lopes Borges Rodrigues (MAPA)

---

Prof. Dr. Nelson Bernardi Lima (Faculdade dos Guararapes)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Sônia Maria Alves de Oliveira (UFRPE)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano (UFRPE)

**RECIFE - PE  
FEVEREIRO - 2017**

A minha amada esposa Maria José dos Santos e a minha filha Ana Luisa da Silva Santos pelo incentivo, amor, dedicação, companheirismo e acima de tudo por compreender a minha ausência em muitos momentos.

### **OFEREÇO**

Aos meus queridos pais, Inácio e Maria Silva, exemplos de vida, integridade e sabedoria, meus eternos educadores. Eles iluminaram meu caminho ensinando que a mais importante forma de se viver é por meio da incansável busca pelo saber sem perder, portanto, a humildade. As minhas irmãs Elane e Eliza e aos sobrinhos Letícia, Maria Clara, Taize, Tamires, Tomas e Túlio pelo carinho.

### **DEDICO**

**‘Que nada me assuste, nada me perturbe.  
Tudo passa, só Deus, porém, não muda.  
A quem tem Deus nada falta.  
Com paciência tudo se alcança,  
Só Deus me basta’.**

**Santa Tereza D’Ávila**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS por ter me dado perseverança, paciência e paz de espírito para realizar mais esta etapa na minha vida profissional e pessoal.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela formação oferecida através do curso de Mestrado e Doutorado em Fitopatologia.

Ao Instituto Federal Pernambuco – Campus Vitória de Santo Antão pelo apoio e incentivo despendidos durante o curso.

À Professora Dra. Elineide Barbosa de Souza por ter acreditado em mim, por todo apoio e confiança depositada durante o doutorado.

À Professora Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano pelos ensinamentos, conselho, amor e confiança. Por sempre nos demonstrar por meio de exemplos que será sempre possível alcançar nossos objetivos com responsabilidade, trabalho sério e organização. Meus sinceros agradecimentos.

À Dra. Maria Angélica Guimarães (EMBRAPA - Semiárido) pela amizade, ajuda, apoio, incentivo e carinho despendido.

Ao Dr. Nelson Bernardi pela amizade, esclarecimentos e atenção despendida durante os trabalhos desenvolvidos.

Aos funcionários da Área de Fitossanidade: Darci Martins e Romildo Angeiras, pela ajuda e amizade despendida ao longo do curso.

A Moisés Freitas, do Laboratório de Genética da Universidade Federal de Pernambuco pelo apoio, dedicação e amizade.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Fitobacteriologia da UFRPE: Myrzânia, Edilaine, Greecy, Kátia, Mirtis, Jéssica, Walkíria, Claudeana, Joelma, Ana Dulce, Alessandra, Luciana, Dayane, Bárbara, Prof. Dr. Marco Aurélio, Adriano, Willams, Emanuel, Leandro Silva, Leandro Velez e Pedro, por todos os momentos compartilhados dentro e fora do laboratório, muito obrigado.

Aos senhores Luiz Coelho e Luiz Silva, pela amizade e apoio durante os trabalhos desenvolvidos em casa de vegetação.

A todos aqueles que mesmos não mencionados, estiveram ao meu lado, contribuindo para a minha formação e para a realização deste estudo, muito obrigado.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	V
RESUMO GERAL.....	VIII
GENERAL ABSTRACT .....	IX
CAPÍTULO I.....	10
SENSIBILIDADE A CÚPRICOS E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> .....	11
INTRODUÇÃO GERAL .....	11
1. Importância econômica da videira .....	11
2. Cancro bacteriano da videira .....	12
3. Taxonomia de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> e diagnose do cancro bacteriano	14
4. Manejo e do cancro bacteriano da videira .....	16
5. Resistência a cúpricos .....	18
6. Estrutura genética de populações.....	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	23
CAPÍTULO II.....	32
Sensibilidade ao cobre e caracterização molecular de genes de resistência em <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> .....	32
RESUMO .....	33
ABSTRACT .....	34
Introdução.....	34
Material e Métodos .....	36
Isolados bacterianos .....	36
Sensibilidade ao cobre <i>in vitro</i> .....	36
Sensibilidade ao cobre <i>in vivo</i> .....	37
Análise dos genes <i>copA</i> e <i>copB</i> em isolados sensíveis e tolerantes ao cobre .....	37
Extração de DNA .....	37
Amplificação e sequenciamento de DNA.....	38
Análise de dados moleculares .....	38
Diversidade genética e divergência intra e inter populacional .....	39
Componentes de adaptabilidade de isolados sensíveis e tolerantes ao cobre .....	39
Resultados .....	41

Sensibilidade ao cobre <i>in vitro</i> .....	41
Sensibilidade ao cobre <i>in vivo</i> .....	41
Análise dos genes <i>copA</i> e <i>copB</i> em isolados sensíveis e tolerantes ao cobre .....	41
Componentes de adaptabilidade de isolados sensíveis e tolerantes ao cobre .....	43
Discussão .....	43
Agradecimentos.....	48
Referências .....	48
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>61</b>
<b>Estrutura genética de populações de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> no Submédio do Vale do São Francisco, Brasil .....</b>	<b>61</b>
RESUMO. ....	62
ABSTRACT .....	63
Introdução .....	63
Material e Métodos .....	65
Isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> .....	65
Extração de DNA .....	65
Análise de rep-PCR.....	65
Análise da diversidade genética.....	66
Resultados .....	66
Discussão .....	67
Agradecimentos.....	70
Referências .....	70
<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>80</b>



## RESUMO GERAL

O cancro bacteriano é uma doença de grande importância econômica para a videira no Submédio do Vale do São Francisco, Nordeste do Brasil. O conhecimento sobre a sensibilidade de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (*Xcv*) ao cobre e a estrutura genética da população é importante para direcionar as estratégias de controle da doença. Os objetivos da pesquisa foram estimar a sensibilidade ao cobre de isolados de *Xcv* obtidos dessa região; comparar a adaptabilidade dos isolados sensíveis e tolerantes ao cobre; realizar análises dos isolados através dos genes *copA* e *copB*; e estudar a estrutura genética de três populações utilizando perfis genômicos de rep-PCR. De 70 isolados analisados quanto a sensibilidade a cúpricos, 23 (33 %) foram classificados como tolerantes ao hidróxido de cobre a  $140 \mu\text{g ml}^{-1} \text{Cu}^{2+}$  e 21 (30 %) ao oxicloreto de cobre a 70 ou  $140 \mu\text{g ml}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ . Dez isolados de cada fenótipo foram selecionados para os ensaios subsequentes. Quando inoculados em mudas de videira pulverizadas com os cúpricos, o período de incubação da doença foi reduzido em até quatro dias nos isolados tolerantes. Os genes *copA* e *copB* estavam presentes nos dois fenótipos dos isolados. As análises realizadas através do gene *copA* revelaram uma elevada similaridade genética compartilhada entre *Xcv* e *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*, *X. citri* subsp. *citri* e *X. arboricola* pv. *juglandis*. Os isolados tolerantes, na ausência do cobre, não apresentaram redução de adaptabilidade em relação a características culturais, crescimento, tolerância a diferentes temperaturas, concentrações de NaCl e níveis de pH, indução de hipersensibilidade e produção de biofilme. Perfis genômicos de rep-PCR de isolados de *Xcv* provenientes de Petrolina-PE (n = 60), Juazeiro-BA (n = 16) e Casa Nova-BA (n = 29) foram analisados determinando-se a diversidade intra e interpopulacional. Alta diversidade haplotípica foi observada em cada população com as técnicas ERIC e REP e baixa diversidade com BOX, no entanto, com valores próximos. A partir da análise de haplótipos foi possível constatar a ausência de estrutura na população com pouco ou nenhum haplótipo compartilhado por isolados das três populações. Na análise da diferenciação haplotípica entre as populações, os valores dos índices analisados foram baixos, o que indica pouca diferenciação genética entre elas. Além disso, as populações apresentaram baixa diversidade global.

Palavras-chave: *Vitis vinifera*, cancro bacteriano, adaptabilidade, resistência ao cobre, diversidade genética, rep-PCR

## GENERAL ABSTRACT

Bacterial canker is a disease of great economic importance for the grapevine, in the “Submédio” of the São Francisco Valley, Northeast of Brazil. To support strategies of disease control, copper sensitivity of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (*Xcv*) and genetic structure of population must be studied. This research aimed to estimate the copper sensitivity of isolates obtained from this region; to compare the adaptability of sensitive and tolerant copper isolates; to perform analyzes on some of these isolates through the genes *copA* and *copB*; and to study the genetic structure of three populations using genomic profiles of rep-PCR. From 70 isolates analyzed, 23 (33 %) were classified as tolerant to copper hydroxide at  $140 \mu\text{g ml}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ , and 21 (30 %) to copper oxychloride at 70 or  $140 \mu\text{g ml}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ . Ten isolates of each reaction phenotype were selected for subsequent assays. When tolerant isolates were inoculated in grapevine seedlings sprayed with the copper, the incubation period of the disease was reduced by up to four days. *CopA* and *copB* genes were present in both phenotypes of the isolates. The analyzes performed with the *copA* gene showed a high shared genetic similarity of sharing between *Xcv* and *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*, *X. citri* subsp. *citri* and *X. arboricola* pv. *juglandis*. In the absence of copper, tolerant isolates did not exhibit reduced adaptability in relation to cultural characteristics, growth, tolerance to different temperatures, NaCl concentrations, pH levels, induction of hypersensitivity and biofilm production. The rep-PCR genomic profiles of *Xcv* isolates from Petrolina-PE (n = 60), Juazeiro-BA (n = 16) and Casa Nova-BA (n = 29) were analyzed to determine the intra- and inter- population diversity. ERIC and REP techniques showed high haplotype diversity in each population while BOX showed low, even though the values were close. The haplotype net detected an absence of structure in the population with few or none haplotype shared by isolates of the three populations. The haplotype differentiation analyzes among populations showed low index values demonstrating low genetic differentiation among them. Moreover, populations presented low global diversity.

Keywords: *Vitis vinifera*, bacterial canker, copper resistance, genetic diversity, Population structure, rep-PCR.

## **CAPÍTULO I**

---

### **Introdução Geral**

## SENSIBILIDADE A CÚPRICOS E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*

### INTRODUÇÃO GERAL

#### 1. Importância econômica da videira

A videira (*Vitis vinifera* L.) é uma das frutíferas mais plantadas no mundo, tanto em regiões tropicais como em regiões temperadas (PEARSON; GOHEEN, 1998). No Brasil é cultivada desde o extremo Sul até o Nordeste (POMMER, 2003). São produzidas uvas finas de mesa, em sua maioria, variedades da espécie *V. vinifera* (europeia), que apresentam bagas grandes e polpa carnosa, representadas principalmente por cultivares como a ‘Itália’ e suas mutações (‘Rubi’, ‘Benitaka’ e ‘Brasil’), ‘Red Globe’, ‘Red Meire’, ‘Patricia’ e as sem sementes como ‘Centennial Seedless’, ‘Superior Seedless’ ou ‘Festival’, ‘Thompson Seedless’, ‘Perlette’, ‘Catalunha’ e ‘Crimson Seedless’. Também são produzidas uvas comuns de mesa, que apresentam bagas médias a grandes, com polpa mucilagínosa, na sua maioria variedades ou híbridos da espécie *V. labrusca* L. (americana), cujas representantes principais são as cultivares Isabel e Niágara Rosada (NACHTIGAL, 2003).

A videira ocupa a 15<sup>o</sup> posição em relação ao valor da produção agropecuária brasileira e o 3<sup>o</sup>. lugar entre as frutas, ficando atrás somente da laranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) e banana (*Musa* spp.) (IBGE, 2015). No ano de 2015, a produção de uva foi de 1.499.353 toneladas numa área de 79.094 hectares, destacando-se como os maiores produtores os estados de Rio Grande do Sul, São Paulo, Pernambuco, Santa Catarina, Paraná e Bahia. Nesse mesmo ano, o Nordeste brasileiro, apresentou uma área total plantada de 47.694 hectares, com uma produção de 1.254.768 toneladas, sendo responsável por 83,69% da produção brasileira de uvas (EMBRAPA, 2016). O plantio de parreirais na região Nordeste do país se concentra no Submédio do Vale do São Francisco, no Polo Petrolina (Pernambuco) – Juazeiro (Bahia), responsável por 95% das exportações brasileiras de uva de mesa (MAPA, 2017). Além da importância econômica, essa cultura também tem um grande impacto social, por absorver grande quantidade de mão-de-obra, empregando de três a quatro pessoas/hectare (LIMA; FERREIRA; DIANESE, 1999; ARAÚJO, 2001).

No Nordeste brasileiro, a vitivinicultura está presente no Submédio do Vale do São Francisco desde o século XVI (LEÃO; POSSÍDIO, 2000). No entanto, seu cultivo foi intensificado na região a partir de 1950 com um aumento expressivo da produção a partir do ano de 1990 (LIMA; MOREIRA, 2002). Nessa região, de clima semiárido tropical, a

temperatura média anual é de 26 °C, com pluviosidade em torno de 500 mm, concentrada entre os meses de janeiro a abril; apresenta variabilidade intra-anual com dias e noites quentes, possibilitando a produção e colheita de uvas com características diferenciadas em diversas épocas do ano. Em virtude da precipitação pluvial insuficiente, técnicas de irrigação são necessárias para garantir o desenvolvimento das plantas e a produção das uvas (TONIETTO; CARBONNEAU, 2004). Estes fatores permitem que se tenha desenvolvimento contínuo e produção ao longo do ano, sendo possível que uma videira produza de duas a três safras, dependendo do ciclo de cada cultivar (PEREIRA; BASSOI, 2008; PEREIRA et al., 2011; TONIETTO; TEIXEIRA, 2004;).

Apesar do alto potencial para produção de uvas finas de mesa no Submédio do Vale do São Francisco, existem problemas fitossanitários que, se não contornados, podem ocasionar sérios prejuízos e diminuir a vida útil dos parreirais instalados a médio/longo prazo. Várias doenças incitadas por bactérias, fungos, nematoides e vírus comprometem a parte aérea e o sistema radicular das plantas, causando perdas expressivas na produtividade dessa cultura. No Brasil, ocorrem apenas duas bacterioses na videira, a galha da coroa (*Rhizobium vitis* Ophel e Kerr) e o cancro bacteriano (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye), sendo esta última considerada um dos principais problemas fitossanitários da cultura (RODRIGUES NETO et al., 2011; TOMAZ et al., 2011).

No Brasil, *X. campestris* pv. *viticola* é uma Praga Quarentenária Presente (A2) e de acordo com a Instrução Normativa SDA nº 59 de 18 de dezembro de 2013, restrita aos estados da Bahia, Ceará, Pernambuco e Roraima (MAPA, 2013). Sendo uma praga de importância econômica potencial, possui programa oficial de controle estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2014).

## **2. Cancro bacteriano da videira**

Na Índia, no ano de 1969, foram observados em videiras da variedade Anab-e-Shahi, sintomas de cancro e manchas foliares que refletiam em perdas de produção (NAYUDU, 1972), sendo esse considerado o primeiro relato da doença. Em março de 1998 o cancro bacteriano da videira foi detectado pela primeira vez no Brasil, em parreirais do Submédio do Vale do São Francisco (cv. Red Globe), mais precisamente no estado de Pernambuco (LIMA; FERREIRA; DIANESE, 1999). Acredita-se que o patógeno foi introduzido inadvertidamente por produtores, através de bacelos da variedade Red Globe trazidos da Índia (FREIRE; OLIVEIRA, 2001). Anos mais tarde, estudos de variabilidade genética realizados por Trindade, Lima e Ferreira (2005), mostraram que os isolados brasileiros e o isolado patotipo

NCPPB 2475, proveniente da Índia, possuíam perfis genômicos muito próximos, o que confirmou essa hipótese de introdução.

Uma vez no Brasil, o patógeno encontrou na região semiárida nordestina condições favoráveis de temperatura para infecção das videiras e disseminação. Ainda no ano de 1998, a doença foi relatada nos estados da Bahia e Piauí (LIMA; FERREIRA; DIANESE, 1999) e, posteriormente, observada nos estados do Ceará (FREIRE; OLIVEIRA, 2001), Goiás (JUNQUEIRA et al., 2006), Minas Gerais (JUNQUEIRA et al., 2006; MARQUES, 2007), Paraná (TOMAZ et al., 2011), Roraima (HALFELD-VIEIRA; NECHET, 2006) e São Paulo (RODRIGUES NETO et al., 2011). A doença foi erradicada da maioria desses estados, sendo o patógeno atualmente encontrado nos estados da Bahia, Ceará, Pernambuco e Roraima (MAPA, 2013). O sucesso da erradicação da doença nestes estados se deve ao diagnóstico imediato da mesma e da baixa extensão de terras cultivadas com videira, diferentemente do Submédio do Vale do São Francisco que apresenta grande extensão de terras cultivadas com esta cultura.

Os primeiros focos do cancro bacteriano em videira no Submédio do Vale do São Francisco foram observados em plantios novos, de dois a três anos de idade, com incidência de até 100% em plantas de 'Red Globe' e em variedades de uvas sem sementes (LIMA; FERREIRA; DIANESE, 1999). Durante os anos de 1998 e 1999, levantamento realizado pelo Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Semiárido, em 358 amostras detectou a bactéria em 197 (55%) amostras, das quais 127 eram de 'Red Globe' (LIMA; MASHIMA, 2000). O cancro bacteriano ainda continua causando grandes perdas, diminuindo o potencial produtivo do Brasil pela redução da colheita de duas para uma safra anual (SILVA, 2011).

No Submédio do Vale São Francisco, os sintomas do cancro bacteriano ocorrem com mais intensidade no primeiro semestre do ano, onde há maior ocorrência de chuvas, alta umidade relativa e temperatura elevada. Os sintomas nas folhas surgem como pontos necróticos de 1-2 mm de diâmetro, com ou sem halos amarelados, que podem coalescer. As folhas persistem na planta mesmo depois de secas. Nas nervuras, os sintomas se caracterizam por manchas necróticas, com ou sem halos amarelados, visualizadas na face abaxial do limbo foliar e que ao coalescerem comprometem grande área (FREIRE; OLIVEIRA, 2001; MALAVOLTA JR. et al., 1999; NAYUDU, 1972), sintoma muito importante para a confirmação da doença a partir de lesões foliares não características e da ausência de cancos distintos na planta. Nos pecíolos e caule ocorrem manchas necróticas, alongadas, com fissuras, denominadas de cancos. Nos ramos e nas ráquis, ocorre a formação de manchas necróticas alongadas, que em sua evolução provocam fissuras longitudinais de coloração

negra (NASCIMENTO; MARIANO, 2004). O principal prejuízo verificado na variedade Red Globe é a redução na produção, pois plantas infectadas produzem cachos com sintomas de cancro no engaço, que prejudicam seu desenvolvimento, impactando a comercialização dos frutos (LIMA; MOREIRA, 2002).

Segundo Lima; Ferreira e Dianese (1999), os sintomas foram detectados com incidência variável nas variedades Itália, Sugraone, Piratininga, Patrícia, Ribier, Catalunha, Brasil e Benitaka. A variedade Red Globe e as variedades sem sementes mostram-se mais suscetíveis quando comparadas às demais variedades utilizadas no Submédio do Vale do São Francisco. *X. campestris* pv. *viticola* pode ser introduzida em parreirais através de mudas e/ou bacelos infectados e ser disseminada, dentro dos parreirais, por restos de cultura infectados que são deixados no pomar ou ainda, através de tesouras de poda não desinfestadas (NASCIMENTO; MARIANO; GAMA, 2005; NAUE, 2014). Segundo Robbs e Rodrigues Neto (1999), pus bacteriano, liberados dos cancros, pode constituir a principal fonte de inóculo à média e curta distância, veiculado em gotículas de água de chuva ou irrigação e infectando tecidos suscetíveis que surgem após a poda. A longa distância, a bactéria pode ser disseminada por materiais de propagação, principalmente mudas (ROBBS; RODRIGUES NETO, 1999) e, eventualmente, por engaços e cachos contaminados (NASCIMENTO; MARIANO; GAMA, 2005).

Temperaturas de 25 a 30°C em conjunto com a alta umidade relativa do ar proporcionam condições favoráveis ao desenvolvimento da doença em campo (CHAND; PATIL; KISHUM, 1991; GAMA, 2014). A bactéria sobrevive de um ciclo para o outro nos cancros de plantas infectadas ou epifiticamente em plantas assintomáticas (ARAUJO, 2001; ARAUJO et al, 2005; GAMA, 2014). A sobrevivência de *X. campestris* pv. *viticola* pode durar até 80 dias em restos culturais, sendo reduzida a 10 dias quando estes são incorporados em sistemas de compostagem (SILVA et al., 2012).

### **3. Taxonomia de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e diagnose do cancro bacteriano**

Quando o cancro bacteriano foi detectado na Índia em 1969, baseado em estudos das características morfológicas e coloração das colônias isoladas, o agente causal da doença foi identificado como *Pseudomonas viticola* Nayudu (NAYUDU, 1972). Em 1978, Young et al. propuseram alterações no sistema de classificação de bactérias fitopatogênicas e oficializaram o uso do termo patovar, sendo *P. viticola* reclassificada como patovar da espécie *Xanthomonas campestris* (VAUTERIN et al., 1995), sendo designada *X. campestris* pv. *viticola* (YOUNG et al., 1978). Todavia, Vauterin et al. (1995) ao estudarem 183 isolados de

*Xanthomonas*, usando ferramentas de biologia molecular, sugeriram que *X. campestris* pv. *viticola* fosse tratada como *Xanthomonas* sp. até que estudos mais esclarecedores fossem realizados a respeito da taxonomia dessa espécie. No entanto, o Comitê sobre a Taxonomia de Fitobactérias da Sociedade Internacional de Fitopatologistas (Committee on the Taxonomy of Plant Pathogenic Bacteria - International Society of Plant Pathology) recomenda o uso do epíteto *X. campestris* pv. *viticola* (BULL et al., 2010). Dessa forma, a nomenclatura *Xanthomonas* sp. não tem sido utilizada em periódicos indexados, nem tão pouco pela legislação brasileira.

*Xanthomonas campestris* pv. *viticola* pertence ao Domínio Bacteria, Filo Proteobacteria, Classe Gamaproteobacteria, Ordem Xanthomonadales e Família Xanthomonadaceae (GARRITY; HOLT, 2000). Essa bactéria apresenta células em forma de bastonete, não capsuladas, uniflageladas, medindo de 1,2 a 2,5 µm (NAYUDU, 1972). É Gram negativa, não apresenta pigmento fluorescente em meio King's B nem atividade de urease e oxidase. Não utiliza asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio, não possui inclusões de poli-β-hidroxibutirato e não tolera concentrações de 1 a 2% de NaCl. Produz ácidos a partir de glucose, manose, galactose, trehalose, frutose e celobiose (LIMA; FERREIRA; DIANESE, 1999). Forma colônias arredondadas, convexas, brilhantes e bordos lisos, com coloração creme-esbranquiçada. Apesar de pertencer ao gênero *Xanthomonas*, *X. campestris* pv. *viticola* não produz o pigmento amarelo xantomonadina, comum a esse gênero. Tem crescimento ótimo em pH 7,5 e temperatura entre 27 e 29°C, não crescendo a 0°C e a 40°C (NASCIMENTO; MARIANO; GAMA, 2005). Araujo (2001) relatou temperatura máxima de 36°C para o crescimento de *X. campestris* pv. *viticola* e Malavolta Jr. et al. (1999) confirmaram crescimento da bactéria a 36°C, mas não a 41°C. A reação de hipersensibilidade é geralmente negativa em folhas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.), mas positiva em folhas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) (MALAVOLTA Jr. et al., 1999).

A diagnose do cancro bacteriano pode ser realizada pelos métodos tradicionais pela avaliação dos sintomas, isolamento em meio de cultura e testes de patogenicidade. O isolamento deste patógeno em meio de cultura foi facilitado quando Peixoto et al. (2006) formularam um meio semi-seletivo NYDAM (ágar nutritivo-dextrose-levedura (NYDA) + ampicilina) que inibe o crescimento de outras bactérias fitopatogênicas e bactérias saprófitas. Porém, os métodos tradicionais podem ser limitantes em função do tempo necessário e da dificuldade de diagnose precoce de plantas assintomáticas.

Métodos mais rápidos para o diagnóstico precoce do cancro bacteriano da videira, inclusive em plantas assintomáticas, estão sendo desenvolvidos e/ou aperfeiçoados. Araujo et



al. (2005) produziram dois anticorpos policlonais (AC 4558 e AC 4560) com limite de detecção até  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>, os quais podem ser utilizados por meio do teste ELISA direto. No entanto, esses anticorpos apresentam reações cruzadas com isolados de *X. vesicatoria* (Doidge) Vauterin et al., *X. campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson e isolados de *X. axonopodis* Starr and Garces associados à anacardiáceas. A partir do sequenciamento parcial do gene *hrpB*, Trindade et al. (2007) desenvolveram oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para uso em PCR. Os *primers* Xcv1F/Xcv3R e RST2/Xcv3R amplificam fragmentos de 243 e 340 pb do gene *hrpB*, respectivamente. No entanto, esses *primers* também amplificam esses fragmentos a partir do DNA de isolados de *Xanthomonas* associados a anacardiáceas e de isolados de *X. campestris* pv. *passiflorae*, sendo considerados semiespecíficos. A análise de RFLP dos produtos de amplificação dos *primers* RST2/Xcv3R com a enzima *HaeIII* gera padrões de restrição distintos para as três fitobactérias (*X. campestris* pv. *viticola*, isolados de *Xanthomonas* associados a anacardiáceas e *X. campestris* pv. *passiflorae* (Pereira) Dye), demonstrando a utilidade desta técnica para o monitoramento de *X. campestris* pv. *viticola* em videiras (TRINDADE et al., 2007).

*Xanthomonas campestris* pv. *viticola* é um patógeno de importância quarentenária, sendo o controle do cancro bacteriano uma preocupação constante considerando a ocorrência muito restrita deste patógeno no país e o risco de seu estabelecimento em outras regiões produtoras de uva nas regiões Sul e Sudeste do Brasil.

#### **4. Manejo do cancro bacteriano da videira**

As recomendações de controle do cancro bacteriano se baseiam na Instrução Normativa nº 2 de 06 de fevereiro de 2014 (MAPA, 2014), onde produtor, importador, comerciante ou detentor de plantas e partes de plantas de espécies do gênero *Vitis*, devem adotar algumas medidas preventivas e de erradicação: I- Desinfestação de veículos, máquinas, implementos, equipamentos e material de colheita, com produtos sanitizantes recomendados pela pesquisa; II- Destruição de material contaminado; controle químico com produtos recomendados pela pesquisa; III- Eliminação de hospedeiras alternativas de *X. campestris* pv. *viticola*; VI- Eliminação de todo o material resultante das podas, por meio de enterrio ou queima, para as variedades mais suscetíveis e sintomáticas; V- Fazer inspeções visuais em todo o viveiro semanalmente, concentrando-se nas variedades mais suscetíveis e nos períodos de condições ambientais favoráveis a ocorrência da doença; e VI- Comunicar imediatamente ao Órgão Oficial de Defesa Agropecuária (Agência de Defesa e Fiscalização Agropecuária de

Pernambuco–ADAGRO) sobre qualquer suspeita de ocorrência do cancro bacteriano da videira.

Não existe, até o momento, cultivares de videira com resistência genética ao cancro bacteriano disponíveis no mercado. Portanto, são recomendadas como medidas preventivas da doença: utilizar mudas e material propagativo com Certificado Fitossanitário de Origem; estabelecimento de quebra-ventos, inspeções periódicas dos parreirais para detectar a presença de sintomas; instalação de tapetes de cal virgem ou pedilúvio com amônia quaternária (0,1%) na entrada da área de produção; evitar o trânsito de máquinas e equipamentos entre áreas produtoras; proceder a desinfestação das tesouras (poda, raleio e colheita) entre cada duas plantas e poda de produção em períodos de baixa precipitação pluviométrica. Para pomares em fase de implantação recomenda-se evitar o sistema de irrigação sobrecopa, tais como a aspersão convencional e pivô central, que favorecem a infecção e a disseminação da bactéria (LIMA; MASHIMA, 2000; LIMA, 2008; LIMA; MOREIRA, 2002). A utilização da técnica de cultura de tecido pode ser uma alternativa para a obtenção de mudas livres de *X. campestris* pv. *viticola* e com boa regeneração (SILVA, 2013).

O procedimento de erradicação das plantas infectadas deve ser adotado quando da detecção da doença em uma área. Lima, Ferreira e Dianese (1999) citaram a erradicação de 100 ha de videiras em produção na região do Submédio do Vale do São Francisco, sendo 85 % dessa área cultivada com a cultivar Red Globe e 15 % com a cultivar Perlette. Em São Paulo, o procedimento de erradicação das plantas infectadas foi adotado, e aproximadamente 4.700 plantas foram destruídas (RODRIGUES NETO et al., 2011). No Paraná, mais precisamente no município de Cianorte parreirais de Red Globe com sintomas de cancro, foram erradicados (TOMAZ et al., 2011). Medidas de erradicação são eficientes, uma vez que dos nove estados onde a doença foi assinalada, continua presente apenas na Bahia, Ceará, Pernambuco e Roraima (MAPA, 2013).

O controle químico do cancro bacteriano é baseado na pulverização das plantas com cúpricos logo após a poda, a brotação e quando há a ocorrência de ferimentos. Embora cúpricos sejam recomendados como método de proteção, minimizando os danos causados e a disseminação da bactéria, não existem produtos químicos registrados para controle do cancro bacteriano no Brasil. Os produtos hidróxido e oxiclreto de cobre não são registrados no Brasil para controle *X. campestris* pv. *viticola* em videira, mas têm registro para o controle de doenças fungicas da videira tais como míldio, antracnose, escoriose, podridão da uva madura, mancha foliar e podridão amarga (AGROFIT, 2014).

Aplicações de cobre repetidas ao longo de várias estações e anos podem levar a seleção de populações tolerantes aos produtos (MENEQUIN et al., 2007). Isolados de *X. campestris* pv. *viticola* com resistência ao cobre já foram detectados (ARAUJO et al., 2003; CHAND; SINGH; SINGH, 1994; MARQUES; UESUGI; FERREIRA, 2009).

## 5. Resistência a cúpricos

Produtos cúpricos têm sido utilizados no controle de doenças bacterianas, como oxiclreto de cobre, sulfato de cobre, hidróxido de cobre e óxido cuproso. O cobre atua na proteção do tecido vegetal contra infecção por bactérias e na redução da população bacteriana na superfície foliar. Entretanto, são necessárias várias aplicações dos produtos para alcançar controle adequado de doenças bacterianas (LEITE JUNIOR, 2000).

O cobre é essencial para várias enzimas envolvidas na respiração, tais como as oxigenases e proteínas de transporte de elétrons. No entanto, acima de uma certa concentração o cobre tem a habilidade de gerar radicais livres capazes de danificar o DNA e membranas lipídicas, sendo tóxico às células. Para evitar danos, o seu nível intracelular deve ser controlado, e para isso, as bactérias desenvolveram sistemas para se proteger da concentração excessiva de cobre (VOLOUDAKIS et al., 2005).

A velocidade do desenvolvimento de resistência pode ser influenciada por vários fatores, tais como a base genética da resistência, as características da linhagem resistente, a natureza do patógeno e da doença, à frequência de aplicação do fungicida, ao grau de cobertura obtido, à persistência na cultura ou no solo e ao tamanho da área tratada (BANDEIRA, 2014; GHINI; KIMATI, 2000).

Uma vez que a resistência ao cobre é adquirida, a pressão colocada pelas aplicações contínuas de sprays de cobre aumenta gradualmente a frequência de populações resistentes do patógeno e compromete a eficácia do cobre (BEHLAU et al., 2013; SUNDIN; JONES; FULBRIGHT, 1989). Isolados resistentes ao cobre foram identificados em várias bactérias fitopatogênicas, incluindo espécies de *Pseudomonas* (ANDERSEN; MENKISSOGLU; LINDOW, 1991; BEHLAU et al., 2013; BENDER et al., 1986; CAZORLA et al., 2002; SUNDIN et al., 1989; SHECK; PSCHIEDT, 1998; ), *Pantoea* (BEHLAU et al., 2013; NISCHWITZ et al., 2007), *Erwinia* (AL-DAOUDE; ARABI; AMMOUNCH, 2009; BEHLAU et al., 2013) e *Xanthomonas*, tais como *X. euvesicatoria* Jones et al. (BEHLAU et al., 2013; MARCO; STALL, 1983; STALL; LOSCHKE; JONES, 1986;), *X. arboricola* pv. *juglandis* Vauterin et al. (BEHLAU et al., 2013; LEE et al., 1994), *X. alfalfae* subsp.

*citrumelonis* (Riker and Jones) Gabriel et al. (SCHAAD et al., 2005; SCHAAD et al., 2006) e *X. citri* subsp. *citri* (Hasse) Gabriel et al. (BEHLAU et al., 2013).

O primeiro relato do desenvolvimento de resistência de *X. campestris* pv. *viticola* a cúpricos e antibióticos foi realizado na Índia por Chand, Singh e Singh (1994), ao avaliarem a eficiência de oxiclreto de cobre, sulfato de estreptomicina, tetraciclina e bacterinol em mudas com diferentes níveis de infecção bacteriana em viveiro num período de quatro anos. No Brasil, inicialmente testes *in vitro* detectaram tolerância de cinco isolados dessa bactéria ao sulfato de cobre em níveis de até 300 µg/mL de íons de Cu<sup>2+</sup> (ARAUJO et al., 2003), sugerindo a ocorrência natural de tolerância nas regiões produtoras do Submédio do Vale do São Francisco, onde o uso de compostos cúpricos é bastante frequente. Posteriormente, Marques, Uesugi e Ferreira (2009) detectaram variabilidade na sensibilidade ao oxiclreto de cobre e ao sulfato de cobre entre 21 isolados de *X. campestris* pv. *viticola* dessa mesma região, com concentração inibitória mínima variando de 10 e 60 µg/mL Cu<sup>2+</sup>, existindo uma tendência para aumento da tolerância ao cobre entre os isolados brasileiros ao longo do anos. Alguns isolados demonstraram tolerância ao cobre até a dosagem de 350 µg/mL Cu<sup>2+</sup>.

Os genes associados à resistência ao cobre em bactérias fitopatogênicas estão localizados predominantemente em plasmídeos (BEHLAU et al., 2012; BEHLAU et al., 2013; BENDER et al., 1990; COOKSEY, 1987; COOKSEY, 1990; STALL; LOSCHKE; JONES, 1986), o que facilita a sua circulação entre diferentes espécies bacterianas e transferência para isolados sensíveis. Transferência horizontal de determinantes de resistência ao cobre através da conjugação é o principal mecanismo para a aquisição de resistência de cobre por bactérias (BEHLAU et al., 2012; BEHLAU et al., 2013; COOKSEY, 1990; STALL; LOSCHKE; JONES, 1986; VOLOUDAKIS et al., 1993;). No entanto, pesquisas indicam que genes de resistência ao cobre em algumas bactérias, tais como espécies de *Pseudomonas* (BEHLAU et al., 2013; LIM; COOKSEY, 1993) e *Xanthomonas* (BASIM et al., 2005; BEHLAU et al., 2013; LEE et al., 1994), pode também estar localizados no cromossomo. É pouco provável que as bactérias tenham adquirido resistência ao cobre por meio de mutações espontâneas, porque esta resistência é regulada por vários genes, nestes organismos (BEHLAU et al., 2013; COOKSEY, 1990;).

A resistência ao cobre conferida por plasmídeos tem sido amplamente estudada nos gêneros *Pseudomonas* e *Xanthomonas*, mostrando que esses sistemas são relacionados e altamente homólogos (VALOUDAKIS et al., 1993). Em isolados de espécies desses gêneros com resistência ao cobre foram descritos diversos operons, denominados *copA*, *copB*, *copC*,

*copD*, *copF*, *copG*, *copL* e *copM* (BEHLAU et al., 2011; COOKSEY, 1990; SILVER; PHUNG, 1996; VALOUDAKIS et al., 2005;).

Em *Pseudomonas* sp. existem dois genes reguladores denominados de *copR* e *copS* e outros quatro genes estruturais, *copABCD*. As proteínas *copA* e *copC* de *P. syringae* pv. *tomato* (Okabe) Young, Dye & Wilkie estão localizadas no espaço periplasmático e *copD* e *copB* na membrana externa (COOKSEY, 1990). Para evitar a toxidez do cobre acumulado em suas células, o mecanismo alternativo aceito é que os íons sejam aproveitados em produtos celulares. Análises mostraram que as proteínas *copA* e *copB* são ricas em metionina e histidina, aminoácidos que se ligam ao cobre. Além disso, essas proteínas estão arranjadas em hélice o que indica a ligação múltipla recobrando os íons do metal (SILVER; PHUNG, 1996). Carzola et al. (2002) verificaram que a maioria dos isolados de *P. syringae* Van Hall de manga (*Mangifera indica* L.), em Portugal e Espanha, resistentes ao cobre, carregavam plasmídeos de 62 kb. Contudo, estes também estavam presentes em isolados sensíveis ao cobre. Os autores demonstraram que esses plasmídeos continham genes parcialmente homólogos ao operon *copABCD*.

Em *Xanthomonas*, o mecanismo de resistência ao cobre e o papel do grupo de genes *copLAB* continuam sem ser totalmente elucidados. Estudos indicam que o sequestro e acumulação de cobre celular é o principal mecanismo de resistência ao cobre em *Xanthomonas* spp., e que o gene *copL* regula a expressão dos genes *copA* e *copB*, que codificam para proteínas de ligação de cobre (BEHLAU et al., 2011; BEHLAU et al., 2013; COOKSEY, 1987; VOLOUDAKIS et al., 2005).

Existe apenas um estudo de detecção de genes de resistência ao cobre com *X. campestris* pv. *viticola*. Utilizando primers desenhados a partir de sequências do gene *copA* de *X. axonopodis* pv. *citri* e *X. campestris* pv. *campestris* foi observada alta homologia entre os produtos de amplificação de isolados de *X. campestris* pv. *viticola* com o gene *copA*, confirmando a existência na espécie de genes de resistência a esses produtos. No entanto, presente também em isolados sensíveis e tolerantes aos cúpricos (MARQUES, 2007).

Para estimar a diversidade genética entre populações sensíveis ou não ao cobre, bem como comparar com outras espécies, diversos índices podem ser utilizados. A diversidade genética intrapopulacional pode ser mensurada através da análise de diversidade haplotípica e nucleotídica, valor K, ou seja, número de grupos genéticos, número de sítios polimórficos e número de transições e transversões utilizando softwares adequados, tais como DnaSP v. 4.0 (ROZAS et al., 2003) e Arlequin v. 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Análises quanto ao nível de diferenciação genética são feitas com base no índice de fixação *Fst* de forma pareada

entre as populações (EXCOFFIER; LISCHER 2010). O número médio de substituições por sítios entre as populações ( $D_{xy}$ ), o número total de substituições por sítios entre as populações ( $D_a$ ), número de polimorfismos compartilhados entre as populações pareadas ( $S_s$ ) e o número de diferenças fixadas entre as populações pareadas ( $S_f$ ) também podem ser determinados (ROZAS et al., 2003). As análises de estruturação genética se baseiam num algoritmo de agrupamento bayesiano para estimar a probabilidade de um indivíduo pertencer a um grupo (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000) e a rede de haplótipos gerada verifica o nível de compartilhamento e a frequência de distribuição dos haplótipos entre as populações (BANDELT; FORSTER; ROHL, 1999).

A ausência de produtos registrados para o controle dessa bacteriose, vem resultando na aplicação de bactericidas à base de cobre para o manejo desta doença no Vale do Submédio do Vale do São Francisco. Portanto, é importante conhecer o perfil de tolerância ao cobre da população presente nos parreirais. Esta informação ajudará a prever melhor o risco de desenvolvimento de resistência em *X. campestris* pv. *viticola*, compreender a origem de tais genes de resistência e em que medida esses genes de resistência ao cobre estão relacionados filogeneticamente em diferentes espécies e patovares de *Xanthomonas*.

Estudos têm mostrado que isolados patogênicos que adquiriram resistência a um agente químico podem ter sua competitividade reduzida na ausência do produto. Custo de adaptabilidade em procariontes é principalmente estudado em bactérias da área médica e ambiental e em relação a antibióticos, com alterações nas características fenotípicas e fisiológicas (ANDERSON, 2006; KANG; PARK, 2010). Poucas pesquisas têm sido desenvolvidas com bactérias fitopatogênicas. Na ausência de sulfato de cobre, isolados de *X. perforans* resistentes foram menos agressivos a plantas de tomateiro do que os sensíveis, indicando redução da adaptabilidade na ausência do produto (ARAÚJO et al., 2012).

É importante também determinar se a resistência ao cobre pode interferir na adaptabilidade de *X. campestris* pv. *viticola*. Variações fenotípicas, potencial reprodutivo, alteração na sensibilidade a temperatura, pH e concentração de sal, e agressividade ao hospedeiro, são apenas alguns exemplos de componentes de adaptabilidade que podem ser estudados em populações de bactérias.

## **6. Estrutura genética de populações**

Estrutura genética refere-se à quantidade e distribuição da variação genética nos indivíduos, entre os indivíduos e entre populações. Essa variação é determinada pela história evolutiva dessa população, resultante da interação de mutação, migração, seleção, deriva e

recombinação (MCDONALD; LINDE, 2002). A evolução está relacionada a mudanças no alelo ou frequências genotípicas em populações, em escalas de tempo relativamente curtas (MILGROOM, 2015).

Uma grande diversidade genética distribuída sobre uma pequena escala espacial indica que uma rápida adaptação de um patógeno a mudanças ambientais pode ter ocorrido. Por outro lado, um alto grau de similaridade genética entre populações coletadas de regiões geográficas afastadas sugere a ocorrência de dispersão a longa distância e fluxo gênico (MCDONALD; ZHAN; BURDON, 1999).

Para avaliar a estrutura populacional de fitopatógenos são utilizados marcadores genéticos, a exemplo de rep-PCR (REP, ERIC E BOX-PCR) e Sequências Simples Repetitivas (SSR) (FRANCISCO, 2014; LEHNER, 2011; SANTIAGO, 2014). Esses marcadores possibilitam inferir sobre a quantidade de variação genética entre indivíduos da mesma população, no tempo e no espaço; as relações genéticas entre os indivíduos dentro e entre linhagens; a localização da fonte de inóculo, a curta ou longa distância; a dinâmica das populações de diferentes genótipos; e a origem do fitopatógeno (MILGROOM, 1997; SCORTICHINI, 2005).

A análise por meio de PCR tem desempenhado importante papel nos estudos de diversidade genética. Sequências repetitivas intergênicas, de consenso, dispersas no genoma bacteriano, conhecidas como ERIC, REP e BOX, geram padrões altamente característicos quando separados em gel de agarose (DE BRUIJN, 1992; VERSALOVIC et al., 1994). As sequências REP consistem de regiões do DNA com repetições invertidas de 35-40 pb e são encontradas em clusters, onde cópias sucessivas são organizadas em orientação alternada. As sequências ERIC têm o tamanho de 124-127 pares de bases. Tanto as sequências ERIC quanto os elementos REP estão localizados em regiões não codificadoras, mas que provavelmente são transcritas e possuem potencial para formar estruturas secundárias. As sequências BOX assemelham-se mais a ERIC quanto ao tamanho, parecendo estar envolvidas na duplicação do DNA. Os padrões de amplificação são menos complexos que os obtidos com REP, mas permitem uma boa discriminação em nível de estirpe (OLIVE; BEAN, 1999). Estes marcadores são usados para avaliar níveis de diversidade genética intra e interespecíficas (LEAL-BERTIOLI, 1998).

Estudos sobre estrutura genética de populações de *X. campestris* pv. *viticola* inexistem, mas já foram realizados com outras fitobactérias, a exemplo de *X. oryzae* pv. *oryzae* (Ishiyama) (ADHIKARI et al., 1995), *X. axonopodis* pv. *manihotis* (Bondar) Vauterin et al. (OGUNJOBI; FAGADE; DIXON, 2006), *Xylela fastidiosa* Wells et al. (FRANCISCO,

2014), *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. (SANTIAGO, 2014) e *X. campestris* pv. *campestris* (MELO, 2016). Esses estudos contribuem para uma melhor compreensão da diversidade da população bacteriana existente em um determinado local, apoiando a adoção de novas tecnologias adequadas ao controle das doenças. Aplicações de bactericidas à base de cobre são utilizadas com frequência no controle de doenças da videira no Submédio do Vale do São Francisco. No Brasil, existem poucos estudos sobre a sensibilidade dos isolados de *X. campestris* pv. *viticola* ao cobre, os quais foram realizados com poucos isolados (ARAUJO et al., 2003; MARQUES; UESUGI; FERREIRA, 2009). Além disso, inexistem estudos sobre a estrutura da população presente nessa região. Diante do exposto, essa tese teve por objetivos: i) determinar a sensibilidade a cúpricos de isolados de *X. campestris* pv. *viticola* oriundos do Submédio do Vale do São Francisco, investigando os genes envolvidos na resistência e a influência na adaptabilidade da bactéria, e ii) determinar a estrutura da população de isolados de *X. campestris* pv. *viticola* através de perfis genômicos de rep-PCR.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHIKARI, T. B.; VERA CRUZ, C. M.; ZHANG, Q.; NELSON, R. J.; SKINNER, D. Z.; MEW, T. W.; LEACH, J. E. Genetic Diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Asia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 3, p. 966-971, 1995.

**AGROFIT** - Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários [on line]. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2014. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/agrofit>>. Acesso em: 16 jan. 2017.

AL-DAOUDE, A.; ARABI, M. I. E.; AMMOUNCH, H. Studying *Erwinia amylovora* isolates from Syria for copper resistance and streptomycin sensitivity. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 91, n. 1, p. 203-205, 2009.

ANDERSEN, G. L.; MENKISSOGLU, O.; LINDOW, S. E. Occurrence and properties of copper-tolerant strains of *Pseudomonas syringae* isolated from fruit trees in California. **Phytopathology**, Oxford, v. 81, n. 6, p. 648-656, 1991.

ANDERSON, D. I. The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 5, p. 461-465, 2006.

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* L.) no Brasil**. 2001, 61 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

ARAUJO, J. S. P.; BUENO, J. R. F.; CRUZ, G. B.; OLIVEIRA, B. C.; ROBBS, C. F.; RIBEIRO, R. L. D.; POLIDORO, J. C. Produção e caracterização de anticorpos policlonais



contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 3, p. 305-309, 2005.

ARAÚJO, E. R.; COSTA, J. R.; FERREIRA, M. A. S. V.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Simultaneous detection and identification of the *Xanthomonas* species complex associated with tomato bacterial spot using species-specific primers and multiplex PCR. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 113, n. 6, p. 1479-1490, 2012.

ARAÚJO, J. S. P.; OLIVEIRA, B. C.; REIS JR, F. B.; ROBBS, C. F.; RIBEIRO, R. L. D. Produção e caracterização de anticorpos policlonais contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, Suplemento, p. 236, 2003.

BANDEIRA, M. A. **Sensibilidade de *Lasiodiplodia theobromae* de pomares de mamão do Nordeste do Brasil a difenoconazole**. 2014, 58 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2014.

BANDEL, H.-J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology Evolution**, Oxford, v. 16, n. 1, p. 37-48, 1999.

BASIM, H.; MINSAVAGE, G. V.; STALL, R. E.; WANG, J. F.; SHANKER, S.; JONES, J. B. Characterization of a unique chromosomal copper resistance gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 12, p. 8284-8291, 2005.

BEHLAU, F.; HONG, J. C.; JONES, J. B.; GRAHAM, J. H. Evidence for acquisition of copper resistance genes from different sources in citrus-associated *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 103, n. 5, p. 409-418, 2013.

BEHLAU, F.; CANTEROS, B. I.; MINSAVAGE, G. V.; JONES, J. B.; GRAHAM, J. H. Molecular characterization of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 12, p. 4089-4096, 2011.

BEHLAU, F.; CANTEROS, B. I.; JONES, J. B.; GRAHAM, J. H. Copper resistance genes from different xanthomonads and citrus epiphytic bacteria confer resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 133, n. 4, p. 949-963, 2012.

BENDER, C. L.; COOSEY, D. A. Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: conjugative transfer and role in copper resistance. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 165, n. 2, p. 534-541, 1986.

BENDER, C. L.; MALVICK, D. K.; CONWAY, K. E.; GEORGE, S.; PRATT, P. Characterization of pXV10A, a copper resistance plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 1, p. 170-175, 1990.

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

- CAZORLA, F.M.; ARREBOLA, E.; SESMA, A.; PÉREZ-GARCIA, A.; CODINA, J.C.; MURILLO, J.; VICENTE, A. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* strains isolated from mango is encoded mainly by plasmids. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, n. 8, p. 909-916, 2002.
- CHAND, R.; PATIL, P. B.; KISHUM, R. Management of bacterial canker disease (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*) of grape vine (*Vitis vinifera*) by pruning. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, New Delhi, v. 61, n. 3, p. 220-222, 1991.
- CHAND, R.; SINGH, P. N.; SINGH, R. Copper and streptomycin resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Zeitschrift fuer Pflanzenkheiten und Planzenschutz**, Stuttgart, v. 101, n. 5, p. 487-491, 1994.
- COOKSEY, D. A. Characterization of a copper resistance plasmid conserved in copper-resistant strains of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 2, p. 454-456, 1987.
- COOKSEY, D. A. Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, n. 1, p. 201-219, 1990.
- DE BRUIJN, F. J. Use of Repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergeneric Consensus) Sequences and the Polymerase Chain Reaction To Fingerprint the Genomes of *Rhizobium meliloti* Isolates and Other Soil Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 7, p. 2180-2187, 1992.
- EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Cultivo da Videira**. 2016. Disponível em: <[www.spo.cnptia.embrapa.br](http://www.spo.cnptia.embrapa.br)>. Acesso em: 02 fev. 2017.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite version 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.
- FRANCISCO, C. S. **Estrutura de populações e inoculações recíprocas de *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* com ocorrência em cultivos vizinhos de *Citrus sinensis* e *Coffea arabica* sob condições do estado de São Paulo**. 2014, 115 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Botucatu, 2014.
- FREIRE, F. C. O; OLIVEIRA, A. D. S.: **Ocorrência do Cancro-bacteriano da Videira no Estado do Ceará**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001. 2 p. (Comunicado Técnico, 62).
- GAMA, M. A. S. **Caracterização polifásica de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e reposição de espécies de *Xanthomonas* patogênicas à videira e cajueiro**. 2014, 138 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2014.
- GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. **An overview of the road map to the manual: Systematic bacteriology**. 2 ed. New York: Springer, 2000. 20p.
- GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v. 1, 78 p

HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. L. Bacterial canker of grapevine in Roraima, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, Suplemento, p. 6098, 2006.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal**. Coordenação de Agropecuária. Brasília: Instituto Brasileiro de geografia e Estatística, 2015. Disponível em: <[www.sidra.ibge.gov.br/Ranking%20produtos%20agropecuários%2015](http://www.sidra.ibge.gov.br/Ranking%20produtos%20agropecuários%2015)>. Acesso em: 02 fev. 2017.

JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNQUEIRA, K. P.; BRAGA, M. F.; VAZ, C. F.; SANTOS, E. C.; JUNQUEIRA, L. P.; SOUZA, L. S.; LIMA, C. A. Ocorrência do cancro bacteriano da videira na região do entorno do Distrito Federal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 19, 2006, Cabo Frio. Frutas do Brasil: Saúde para o Mundo. **Palestras e Resumos...** Cabo Frio - RJ: SBF/UENF/UFRRJ, 2006. p. 323.

KANG, Y. S.; PARK, W. Trade-off between antibiotic resistance and biological fitness in *Acinetobacter* sp. strain DR1. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 12, n. 5, p. 1304-1318, 2010.

LEÃO, P. C. S.; POSSÍDIO, E. L. Histórico da videira. In: SOUZA LEÃO, P. C.; SOARES, J. M. (Ed.). **A viticultura no Semiárido brasileiro**. Petrolina: EMBRAPA CPATSA, p. 13-17, 2000.

LEAL-BERTIOLI, S. C. DE M. O enfoque molecular na sistemática de fungos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 6, p. 197-230, 1998.

LEE, Y. A.; HENDSON, M.; PANAPOULOS, N. J.; SCHROTH, M. N. Molecular cloning, chromosomal mapping, and sequence analysis of copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*: homology with small blue copper proteins and multicopper oxidase. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 176, n. 1, p. 173-188, 1994.

LEHNER, M. S. **Estrutura genética da população de *Sclerotinia sclerotiorum* em feijoads de Minas Gerais**. 2011, 42 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

LEITE JÚNIOR, R. P. Surviving with Citrus Canker in Brazil. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR CITRICULTURE, 9, 2000, Orlando. **Proceedings...** Flórida, 2000. p. 890-896.

LIM, C.; COOKSEY, D. A. Characterization of chromosomal homologs of the plasmid-borne copper resistance operon of *Pseudomonas syringae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 175, n. 14, p. 4492-4498, 1993.

LIMA, M. F. Doenças que comprometem a produção e a comercialização da uva. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE VITICULTURA DO SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO, I, 2008, PERNAMBUCO. **Anais...** Petrolina: Embrapa Semiárido, 2008. p. 13-14.

LIMA, M. F.; FERREIRA, M. A. S. V.; DIANESE, J. C. Situação do cancro da videira causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* no Submédio do Vale do São Francisco em 1999. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 3, p. 250, 1999.

LIMA, M. F.; MASHIMA, C. H. Tratamento químico e térmico de bacelos de videira infectados com *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, Suplemento , p. 324, 2000.

LIMA, M. F.; MOREIRA, W. A. Doenças causadas por bactérias. In. ALENCAR, J. A. **Uva de mesa: fitossanidade**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. p. 27-34. (Frutas do Brasil, 14).

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

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa SDA Nº 59** [on line]. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2013. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 06 jan. 2017.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa SDA Nº 2** [on line]. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2014. Disponível em: <[www.jusbrasil.com.br/diarios](http://www.jusbrasil.com.br/diarios)>. Acesso em: 06 jan. 2017.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO . **Uva** [on line]. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2017. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/uva>>. Acesso em: 02 fev. 2017.

MARCO, G. M.; STALL, R. E. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, n. 7, p. 779-781, 1983.

MARQUES, E. **Variabilidade e tolerância ao cobre em *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, agente causal do cancro bacteriano da videira (*Vitis* spp.)**. 2007, 129 f. Dissertação (Mestrado 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**, Brasília, v. 34, n. 6, p. 406-411, 2009.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of phytopathology**, Palo Alto, v. 40, n. 1, p. 349-379, 2002.

MCDONALD, B. A.; ZHAN, J.; BURDON, J. J. Genetic structure of *Rhynchosporium secalis* in Australia. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 89, n. 8, p. 639-645, 1999.

MELO, E. A. **Estrutura de população e caracterização filogenética de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* do estado de Pernambuco**. 2016, 82 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.

- MENEGUIN, L.; RINALDI, D.A. M. F.; SANTOS, A. C. A.; RODRIGUES, L. S.; SILVA, M. R. L.; CANTERI, M. G.; LEITE JR, R. P. Sensibilidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ao cobre e mancozeb. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 3, p. 247-252, 2007.
- MILGROOM, M. G. Genetic variation and the application of genetic markers for studying plant pathogen populations. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 79, n. 1, p. 1-13, 1997.
- MILGROOM, M. G. (Ed.). **Population biology of plant pathogens: genetics, ecology and evolution**. 1. ed. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, 2015. v. 1, 399 p.
- NACHTIGAL, J. C. Avanços tecnológicos na produção de uvas de mesa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 10, 2003, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. p. 167-170.
- NAYUDU, M. V. *Pseudomonas viticola* sp. nov., incitant of a new bacterial disease of grapevine. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 73, n. 2, p. 183-186, 1972.
- NASCIMENTO, A. R. P.; MARIANO, R. L. R. Cancro bacteriano da videira: etiologia, epidemiologia e medidas de controle. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 304-307, 2004.
- NASCIMENTO, A. R. P.; MARIANO, R. L. R.; GAMA, M. A. S. Métodos de preservação e crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em meio de cultura variando temperatura, pH e concentração de NaCl. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 6, p. 650-654, 2005.
- NAUE, C. R.; BARBOSA, M. A. G.; BATISTA, D. C.; SOUZA, E. B.; MARIANO, R. L. R. Efeito do tratamento de bacelos de videira 'Red Globe' no controle do cancro bacteriano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 4, p. 853-861, 2014.
- NISCHWITZ, C.; PAPPU, H. R.; MULLIS, S. W.; SPARKS, A. A.; LANGSTON, D. R.; CSINOS, A. S.; GITAITIS, R. D. Phylogenetic analysis of Iris yellow spot virus isolates from Onion (*Allium cepa*) in Georgia (USA) and Peru. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 155, n. 9, p. 531-535, 2007.
- OGUNJOBI, A. A.; FAGADE, O. E.; DIXON, A. G. O. Molecular variation in population structure of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihots* in the South eastern Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 5, n. 20, p. 1868-1872, 2006.
- OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 6, p. 1661-1669, 1999.
- PEARSON, R. C.; GOHEEN, A. C. (Eds). **Compendium of grape diseases**. 4. ed. Saint Paul: APS Press, 1998. v. 1, 93 p.
- PEIXOTO, A. R.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R.; VIANA, I. O. Reação de clones de videira a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, baseada nos componentes epidemiológicos do cancro bacteriano. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 1-7. 2006.

PEREIRA, G. E.; ARAÚJO, A. J. B.; SANTOS, J.; VANDERLINDE, R.; LIMA, L. L. A. Chemical and aromatic characteristics of Brazilian tropical wines. **Acta horticulturae**, Holanda, v. 1, n. 910, p. 135-140, 2011.

PEREIRA, G. E.; BASSOI, L. H. Production of Syrah wines in tropical conditions of northeast Brazil. In: INTERNATIONAL SYRAH SYMPOSIUM, 1, 2008, Lyon. **Anais...** France, 2008. p. 45-49.

POMMER, C. V.; MAIA, M. L. Introdução. In: POMMER, C. V. (Ed.). **Uva: tecnologia de produção, pós-colheira, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003. p. 11-35.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, New York, v. 155, n. 2, p. 945 – 959, 2000.

ROBBS, C. F.; RODRIGUES NETO, J. Enfermidades causadas por bactérias em frutíferas tropicais no Brasil. Videira: cancro bacteriano dos ramos e bagas ou crestamento das folhas. **Summa Phytopatologica**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 51-52, 1999.

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

ROZAS, J.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C.; MESSEGUER, X.; ROZAS, R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, London, v. 19, n. 18, p. 2496-2497, 2003.

SANTIAGO, T. R. **A deep analysis of the genetic structure of *Ralstonia solanacearum* in Brazil reveals not much sex in the population**. 2014, 85 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G. H.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P. E.; STROMBERG, V. K.; VIDAVER, A. K. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. rev. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. rev.; and “var. *fuscans*” of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 28, n. 6, p. 494–518, 2005.

SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; SECHER, 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, n. 8, p. 690-695, 2006.

SCHECK, H. J.; PSCHEIDT, J. W. Effect of copper bactericides on copper-resistant and – sensitive strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, n. 4, p. 397-406, 1998.

SCORTICHINI, M. The population structure of some plant pathogenic bacteria: an ecological and adaptive perspective. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 87, n. 1, p. 5-12, 2005.

SILVA, W. L. M. **Bactérias de filoplano de maracuzajeiro como agente de controle biológico da mancha-bacteriana**. 2013, 84 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Roraima, Roraima, 2013.

SILVA, M. S. **Estudo da reação dos genótipos de videira quanto a resistência a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* no Submédio do Vale do São Francisco**. 2011, 62 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade do Estado da Bahia, Bahia, 2011.

SILVA, A. M. F.; MENEZES, E. F.; SOUZA, E. B.; MELO, N. F.; MARIANO, R. L. R. SOBREVIVÊNCIA DE *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* EM TECIDO INFECTADO DE VIDEIRA. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 3, p. 757-765, 2012.

SILVER, S.; PHUNG, L. T. Bacterial heavy metal resistance: New Surprises. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 50, p. 753-789, 1996.

STALL, R. E.; LOSCHKE, D. C.; JONES, J. B. Linkage of copper resistance and avirulence loci on a sel-transmissible plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 76, n. 2, p. 240-243, 1986.

SUNDIN, G. W.; JONES, A. L.; FULBRIGHT, D. W. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from cherry orchards and its associated transfer in vitro and in planta with a plasmid. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, n. 8, p. 861-865, 1989.

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. 131, 2011.

TONIETTO, J. ; TEIXEIRA, A. H. C. Zonage climatique dès périodes viticoles de production dans l'année em zonage tropicale: application de la méthodologie du Système CCM Géoviticole. In: Joint International Conference on Viticultural Zoning, 1, 2004. Cape Town. **Anais...** South Africa, p.193-201.

TONIETTO, J.; CARBONNEAU, A. A multicriteria climatic classification system for grape-growing regions worldwide. **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam, v.124, n.1-2, p. 81-97, 2004.

TRINDADE, L. C.; LIMA, M. F.; FERREIRA, M.A.S.V. 2005. Molecular characterization of Brazilian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira** 30: 46-54.

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

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

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic Fingerprinting of Bacteria Using Repetitive Sequence-Based Polymerase Chain Reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v. 5, n. 1, p. 25-40, 1994.

VOLOUDAKIS, A. E.; BENDER, C. L.; COOKSEY, D. A. Similarity between copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* and *Pseudomonas syringae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 5, p. 1627-1634, 1993.

VOLOUDAKIS, A. E.; REIGNIER T.M.; COOKSEY D.A. Regulation of resistance to copper in *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 2, p. 782-789, 2005.

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



## CAPÍTULO II

---

**Sensibilidade ao cobre e caracterização molecular de genes de  
resistência em *Xanthomonas campestris* pv. *viticola***

1 **Sensibilidade ao cobre e caracterização molecular de genes de resistência em**  
2 ***Xanthomonas campestris* pv. *viticola***

3

4 Elias Inácio da Silva<sup>1</sup>, Nelson Bernardi Lima<sup>1</sup>, Moisés Thiago de Souza Freitas<sup>2</sup>, Myrzânia de  
5 Lira Guerra<sup>1</sup>, Maria Angélica Guimarães Barbosa<sup>3</sup>, Marco Aurélio Siqueira da Gama<sup>1</sup>, Rosa  
6 de Lima Ramos Mariano<sup>1</sup>, Elineide Barbosa de Souza<sup>4</sup>

7

8 <sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco – Departamento de Agronomia, Av. Dom  
9 Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos – 52171-900 – Recife, PE – Brasil.

10 <sup>2</sup>Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Genética, Av. Prof. Moraes Rego,  
11 1235 - Cidade Universitária - 50670-901 – Recife, PE – Brasil.

12 <sup>3</sup> Embrapa Semi Árido, BR 428, Km 152, Zona Rural, Caixa Postal 23 - 56302-970 –  
13 Petrolina, PE - Brasil.

14 <sup>4</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco – Departamento de Biologia, Av. Dom Manoel  
15 de Medeiros, s/n, Dois Irmãos – 52171-900 – Recife, PE – Brazil.

16 \*Autor correspondente <elineidebs@yahoo.com.br>

17

18 RESUMO: O cancro bacteriano é uma doença de grande importância econômica para a  
19 videira no Submédio do Vale do São Francisco, Brasil. Para tentar minimizar os danos  
20 causados por esta doença, foi estimada a sensibilidade ao cobre de isolados de *Xanthomonas*  
21 *campestris* pv. *viticola*, obtidos dessa região no período de 1998 a 2014, e realizadas  
22 comparações de adaptabilidade dos isolados sensíveis e tolerantes ao cobre. Além disso,  
23 análises foram realizadas em alguns destes isolados através dos genes *copA* e *copB*. De 70  
24 isolados analisados, 23 isolados (33 %) foram classificados como tolerantes ao hidróxido de  
25 cobre a 140 µg mL<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> e 21 isolados (30 %) ao oxiclreto de cobre a 70 ou 140 µg mL<sup>-1</sup>  
26 Cu<sup>2+</sup>. Os demais isolados foram considerados sensíveis. Portanto, dez isolados de cada  
27 fenótipo tolerantes e sensíveis foram selecionados para os ensaios subsequentes. Quando  
28 inoculados em mudas de videira pulverizadas com os cúpricos, o período de incubação da  
29 doença foi reduzido em até quatro dias nos isolados tolerantes. Os genes *copA* e *copB* estavam  
30 presentes nos dois fenótipos dos isolados, mas não estavam envolvidos na resistência ao  
31 cobre. Os isolados tolerantes, na ausência do cobre, não apresentaram redução de  
32 adaptabilidade em relação a características culturais, crescimento, tolerância a diferentes  
33 temperaturas, concentrações de NaCl e níveis de pH, indução de hipersensibilidade e  
34 produção de biofilme. Esses resultados sugerem que a utilização de cúpricos no controle do

35 cancro bacteriano da videira no Submédio do Vale do São Francisco deve ser integrada a  
36 outras medidas de controle, visando prevenir a prevalência de indivíduos tolerantes ao cobre.

37

38 Palavras-chave: Videira, cancro bacteriano, adaptabilidade, resistência ao cobre, diversidade  
39 genética

40

41 ABSTRACT: Bacterial canker is a disease of great economic importance for the grapevine, in  
42 the “Submédio” of the São Francisco Valley, Brazil. To minimize the damage caused by this  
43 disease, copper sensitivity of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, were obtained in this  
44 region, from 1998 to 2014, and made adaptive comparisons of sensitive and copper tolerant  
45 isolates. In addition, analyzes were performed on some of these isolates through the genes  
46 *copA* and *copBr*. From 70 isolates analyzed, 23 isolates (33 %) were classified as tolerant to  
47 copper hydroxide at 140 µg mL Cu<sup>2+</sup>, and 21 isolates (30 %) to 70 or 140 µg mL Cu<sup>2+</sup> copper  
48 oxychloride. The remaining isolates were considered sensitive. Therefore, ten isolates of each  
49 phenotype, tolerant and sensitive were selected for subsequent assays. When inoculated in  
50 vine seedlings sprayed with the copper, the incubation period of the disease was reduced by  
51 up to four days in the tolerant isolates. *CopA* and *copB* genes were present in both phenotypes  
52 of the isolates, but were not involved in copper resistance. Tolerant isolates, in the absence of  
53 copper, did not exhibit reduction of adaptability in relation to cultural characteristics, growth,  
54 tolerance to different temperatures, NaCl concentrations, pH levels, and induction of  
55 hypersensitivity and biofilm production. These results suggest that the use of copper in the  
56 control of grapevine bacterial cancer in the “Submédio” region of the São Francisco Valley  
57 should be integrated with other control measures to prevent the prevalence of copper tolerant  
58 individuals.

59

60 Keywords: Grapevine, bacterial canker, adaptability, copper resistance, genetic diversity

61

## 62 **Introdução**

63

64 O cancro bacteriano, causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye,  
65 é a principal doença bacteriana da videira nas áreas irrigadas do Submédio do Vale do São  
66 Francisco, nos estados de Pernambuco e Bahia, Nordeste do Brasil. A doença restringe a  
67 produtividade das lavouras, limita a venda de uvas nos mercados interno e de exportação e a  
68 comercialização de material propagativo.

69 *X. campestris* pv. *viticola* é considerada uma praga quarentenária presente (A2) no  
70 Brasil (MAPA, 2013), com programa oficial de controle do cancro bacteriano estabelecido  
71 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Embora não exista o registro de  
72 produtos químicos para o controle do cancro bacteriano no Brasil (Agrofit, 2014) fungicidas  
73 cúpricos são utilizados no tratamento preventivo através da pulverização das plantas,  
74 principalmente após a poda.

75 O maior risco no uso contínuo de cobre para controle de doenças bacterianas é a  
76 seleção de isolados resistentes, o que dificulta o controle (Sundin et al., 1989). Isolados  
77 resistentes ao cobre foram identificados em várias espécies de *Xanthomonas*, como *X.*  
78 *euvesicatoria* (Stall et al., 1986; Behlau et al., 2013), *X. arboricola* pv. *juglandis* (Lee et al.,  
79 1994; Behlau et al., 2013), *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* e *X. citri* subsp. *citri* (Behlau et al.,  
80 2013). Em *X. campestris* pv. *viticola*, o primeiro relato do desenvolvimento de resistência a  
81 cúpricos foi realizado na Índia, onde a doença é endêmica e a bactéria é nativa (Chand et al.,  
82 1994). No Brasil, a tolerância ao sulfato e oxiclreto de cobre foi detectada em diferentes  
83 dosagens em isolados da bactéria oriundos do Submédio do Vale do São Francisco (Marques  
84 et al., 2009).

85 Os genes associados à resistência ao cobre em bactérias fitopatogênicas estão  
86 localizados predominantemente nos plasmídeos (Stall et al. 1986; Bender et al. 1990;  
87 Cooksey, 1990; Behlau et al., 2012) e a resistência é regulada por vários genes (Cooksey,  
88 1990). Estudos com espécies dos gêneros *Pseudomonas* e *Xanthomonas* evidenciaram que  
89 esses sistemas são relacionados e altamente homólogos (Valoudakis et al., 1993) tendo sido  
90 descritos os operons *copA*, *copB*, *copC*, *copD*, *copF*, *copG*, *copL* e *copM* (Cooksey, 1990;  
91 Silver and Phung, 1996; Valoudakis et al., 2005; Behlau et al., 2011). Acredita-se que o  
92 sequestro e acumulação de cobre celular é o principal mecanismo de resistência ao cobre em  
93 *Xanthomonas* spp., e que o gene *copL* regula a expressão dos genes *copA* e *copB*, que  
94 codificam para proteínas de ligação de cobre (Cooksey, 1987; Voloudakis et al., 2005; Behlau  
95 et al., 2011; Behlau et al., 2013).

96 Outro aspecto importante a ser considerado na resistência de fitopatógenos a produtos  
97 químicos é a adaptabilidade das populações resistentes. Em fungos, por exemplo, a  
98 adaptabilidade, de um patógeno em se desenvolver, reproduzir, sobreviver e causar doença, é  
99 um aspecto a ser investigado na resistência a fungicidas (Ma and Michailides, 2005). Em  
100 relação a bactérias resistentes a cúpricos, estudos de adaptabilidade são escassos (Araújo et  
101 al., 2012). Dentre outros aspectos, variações fenotípicas, potencial reprodutivo, alteração na  
102 sensibilidade a temperatura, pH e concentração de sal, e agressividade ao hospedeiro, podem

103 ser utilizados para investigar a adaptabilidade de isolados de *X. campestris* pv. *viticola*  
104 tolerantes ao cobre.

105 Aplicações de bactericidas à base de cobre são utilizadas para o controle do cancro  
106 bacteriano da videira no Submédio do Vale do São Francisco, e existem poucos estudos no  
107 Brasil sobre a sensibilidade dos isolados de *X. campestris* pv. *viticola* ao cobre, os quais  
108 foram realizados com poucos isolados (Marques et al., 2009). Esse conhecimento é  
109 importante para eficácia das práticas de controle baseadas no uso de cobre. Portanto, esse  
110 estudo teve como objetivos (i) caracterizar a sensibilidade de 70 isolados de *X. campestris* pv.  
111 *viticola* a hidróxido e oxicloreto de cobre, (ii) investigar o envolvimento dos genes *copA* e  
112 *copB* na resistência da bactéria ao cobre e estabelecer a relação com diferentes espécies de  
113 *Xanthomonas*, e (iii) determinar se a resistência ao cobre interfere em componentes de  
114 adaptabilidade do patógeno.

115

## 116 **Material e Métodos**

117

### 118 **Isolados bacterianos**

119 Setenta isolados de *X. campestris* pv. *viticola*, obtidos de videiras infectadas coletados  
120 entre os anos de 1998 (ano de introdução da doença) a 2014 na região do Submédio do Vale  
121 do São Francisco, foram usados para avaliar a sensibilidade ao hidróxido ( $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ) e  
122 oxicloreto de cobre ( $\text{Cu}_2\text{Cl}(\text{OH})_3$ ). Os isolados pertencem a Coleção de Culturas Rosa  
123 Mariano do Laboratório de Fitobacteriologia da UFRPE e foram identificados com os *primers*  
124 *Xcv1F/Xcv3R* por Gama (2014). Para fins comparativos, foi utilizado o isolado indiano  
125 NCPPB 2475= IBSBF 1967, patótipo de *X. campestris* pv. *viticola*, obtido na Coleção de  
126 Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico de São Paulo.

127

### 128 **Sensibilidade ao cobre *in vitro***

129 Foram testados como fontes de íons de cobre soluções de hidróxido de cobre (Kocide,  
130 35 % P.A., DuPont<sup>TM</sup>, Barueri, SP, Brasil) e o oxicloreto de cobre (Cuprocarb, 35 % P.A.,  
131 Oxiquímica<sup>®</sup>, Jaboticabal, SP, Brasil). Esses produtos foram selecionados pelo fato de serem  
132 utilizados pelos produtores no Submédio do Vale do São Francisco no controle de doenças em  
133 videiras. Os produtos foram adicionados ao meio mínimo para complexar o cobre (MMCC)  
134 (Pohronezny et al., 1992), nas concentrações finais de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 140, 210,  
135 280, 350 e 420  $\mu\text{g mL}^{-1}$   $\text{Cu}^{2+}$ . As bactérias foram cultivadas em meio ágar nutritivo-dextrose-  
136 levedura (NYDA) (Pusey and Wilson, 1984) e após 36 h as suspensões bacterianas foram

137 preparadas em água destilada esterilizada (ADE) e ajustadas a concentração de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>,  
138 usando o espectrofotômetro 500 M (Analyser, São Paulo, SP, Brasil). Uma alíquota de 5 µL  
139 destas suspensões foi adicionada ao meio MMCC, em cinco pontos equidistantes,  
140 representando o número de repetições por isolado. As placas foram mantidas a 28 °C e após  
141 72 h verificou-se a presença ou ausência de crescimento bacteriano confluyente, equivalente ao  
142 crescimento no meio MMCC sem cobre das placas controle. O experimento foi repetido uma  
143 vez. Os isolados foram classificados como sensíveis e tolerantes ao cobre e isolados  
144 representativos desses fenótipos foram selecionados para os ensaios subsequentes.

145

#### 146 **Sensibilidade ao cobre *in vivo***

147 Mudas de videira cv. Red Globe tratadas com produtos na concentração utilizada por  
148 produtores no Submédio do Vale do São Francisco. Plântulas com aproximadamente 100 dias  
149 de idade da cv. Red Globe tiveram as folhas pulverizadas até o escorrimento, em ambas as  
150 superfícies, com 3 g hidróxido de cobre L<sup>-1</sup> de água ou 3 g oxiclreto de cobre L<sup>-1</sup> de água.  
151 Após 24 h, as folhas foram inoculadas com a bactéria utilizando o método de fricção com  
152 gaze. Uma almofada formada por uma camada dupla de gaze seca foi levemente friccionada  
153 na parte adaxial da folha, que em seguida foi pulverizada com suspensão bacteriana a  $10^8$   
154 UFC mL<sup>-1</sup> até o escorrimento. Folhas não tratadas com os cúpricos constituíram o controle  
155 negativo. O delineamento experimental para cada produto em separado, foi inteiramente  
156 casualizado com três repetições, sendo cada repetição constituída por uma folha. Após as  
157 inoculações, as mudas foram mantidas em casa de vegetação e avaliadas diariamente durante  
158 40 dias para determinação do Período de Incubação, que corresponde ao tempo (dias) entre a  
159 inoculação e o surgimento dos primeiros sintomas, e incidência da doença, a qual consiste na  
160 porcentagem de folhas inoculadas que apresentaram sintoma de cancro bacteriano aos 40 dias  
161 após as inoculações. As diferenças entre os isolados de *X. campestris* pv. *viticola* sensíveis e  
162 tolerantes ao cobre foram determinados pelo teste t-Student ( $P \leq 0,05$ ). As análises estatísticas  
163 foram realizadas com o programa Statistix v. 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL,  
164 USA).

165

#### 166 **Análise dos genes *copA* e *copB* em isolados sensíveis e tolerantes ao cobre**

167

#### 168 **Extração de DNA**

169 A extração de DNA dos isolados foi realizada utilizando-se o Kit MiniPrep (Axygen  
170 Biosciences, Union City, USA), seguindo as recomendações do fabricante. A qualidade da

171 extração foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1 % preparado em  
 172 tampão TBE 0,5X (5,4 g de Tris-base; 2,75 g de ácido bórico e 0,375 g de EDTA, para 1000  
 173 ml) por 1,5 h a 80 V. As amostras foram diluídas a uma concentração final de 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$   
 174 DNA e armazenadas a -20 °C.

175

### 176 **Amplificação e sequenciamento de DNA**

177 Para amplificação dos genes *copA* e *copB* foram utilizados os *primers* *copAF* (5'  
 178 CCTCCATGGCACGGACACTTCCATC 3') e *copAR* (5'  
 179 CCAGACATATCCATCGACCCATGATCCA 3') e *copBF* (5'  
 180 CTCAGGATCACTCTGCACATCA 3') e *copBR* (5'  
 181 GCACGTAGCTCTTAATCGAGTTGTC 3'), respectivamente, desenhados a partir da  
 182 sequência de nucleotídeos de genes de resistência ao cobre de *X. citri* subsp. *citri* (Behlau et  
 183 al., 2012) e sintetizados pela Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Os primers foram  
 184 selecionados devido à presença de genes homólogos de resistência ao cobre no cromossomo  
 185 de *X. citri* subsp. *citri* e outras *Xanhomonas* spp. (Potinis et al., 2011; Behlau et al., 2012).

186 A PCR foi realizada em termociclador modelo PTC-100 (MJ Research, Estados  
 187 Unidos). As reações de PCR foram compostas por 12,5  $\mu\text{L}$  de PCR 1X Master Mix (0,05 U/ $\mu\text{L}$   
 188 de Taq DNA polimerase, tampão de reação, 4 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,4 mM de cada dNTP), 0,25  
 189  $\mu\text{M}$  de cada primer e 100 ng de DNA, para um volume final de 25  $\mu\text{L}$ . As condições da PCR  
 190 consistiram de desnaturação inicial a 95 °C/5min, 30 ciclos de 95 °C/45s, 60 °C/30s e 72  
 191 °C/1min para desnaturação, anelamento e extensão, respectivamente, e 72 °C/10min para  
 192 extensão final para os *primers* *copAF/copAR*. Para os *primers* *copBF/copBR* foram utilizadas  
 193 temperatura de 95°C/5min, 30 ciclos de 95° C/30s, 60 °C/30s e 72 °C/40s e 72 °C/10min. As  
 194 amostras foram coradas com SYBR® Safe DNA Gel Stain (10X) e 3  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi  
 195 submetida a eletroforese em gel de agarose a 1,0 % por 40 min. O marcador GeneRuler 100  
 196 pb DNA Ladder (Fermentas Life Sciences, Burlington, Canadá) foi utilizado para determinar  
 197 o tamanho dos fragmentos amplificados.

198 A purificação dos produtos de PCR foi realizada com auxílio do Kit Clean-up  
 199 (Axygen Biosciences, Union City, USA) e o sequenciamento das fitas *foward* e *reverse* foi  
 200 realizado pela MacroGen® (Seul, Coréia do Sul).

201

### 202 **Análise de dados moleculares**

203 As análises de qualidade das sequências de nucleotídeos e a montagem dos contigs  
 204 foram realizadas utilizando o software Staden Package (Staden et al., 1998), utilizando um

205 valor de PHRED 30, como parâmetro de confiabilidade. O alinhamento das múltiplas  
206 sequências de nucleotídeos foi realizado utilizando o software Clustal W, implementado na  
207 suite do MEGA v.5 (Tamura et al., 2011), e ajustado manualmente quando necessário.

208

### 209 **Diversidade genética e divergência intra e inter populacional**

210 Os índices de diversidade genética de isolados tolerantes e sensíveis ao cobre foram  
211 calculados utilizando-se as sequências dos genes *copA* e *copB* dos 20 isolados de *X.*  
212 *campestris* pv. *viticola* sequenciados neste estudo. As sequências de seis isolados de *X.*  
213 *alfalfae* subsp. *citrumeloni*, cinco isolados de *X. citri* subsp. *citri*, seis isolados *X. vesicatoria*,  
214 15 isolados de *X. euvesicatoria*, três isolados de *X. arboricola* foram obtidas no GenBank e  
215 utilizadas para estabelecer a relação com *X. campestris* pv. *viticola*.

216 A diversidade genética foi mensurada através da diversidade haplotípica e  
217 nucleotídica, número de sítios polimórficos e número de haplótipos utilizando o software  
218 DnaSP v. 4.0 (Rozas et al., 2003).

219 Análises do nível de diferenciação genética foram realizadas com base no índice de  
220 fixação  $F_{st}$  de forma pareada entre as populações sensíveis e tolerantes ao cobre usando o  
221 software Arlequin v. 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010).

222 O número médio de substituições por sítios entre as populações (Dxy), número total de  
223 substituições por sítios entre as populações (Da), número de polimorfismos compartilhados  
224 entre as populações pareadas (Ss) e número de diferenças fixadas entre as populações  
225 pareadas (Sf) foram calculados no software DnaSP v. 4.0 (Rozas et al., 2003).

226 A rede de haplótipos foi gerada através do software NETWORK v. 4.6 (www.fluxus-  
227 engineering.com) utilizando o método Median-joining (Bandelt et al., 1999) para verificar o  
228 nível de compartilhamento e a frequência de distribuição dos haplótipos entre as populações.

229

### 230 **Componentes de adaptabilidade de isolados sensíveis e tolerantes ao cobre**

231 Os seguintes componentes de adaptabilidade foram determinados para os isolados *X.*  
232 *campestris* pv. *viticola* sensíveis e tolerantes ao cobre: características fenotípicas das colônias,  
233 crescimento em meio líquido, alteração na sensibilidade a temperatura, pH e concentração de  
234 sal, reação de hipersensibilidade e produção de biofilme.

235 Os isolados foram cultivados em meio NYDA e incubados por 48 h, sendo analisada a  
236 variação fenotípica das colônias quanto à cor, forma, borda, superfície e aspecto. Foi também  
237 determinado o crescimento em meio líquido NYD (sem ágar), avaliado após 24 h através da  
238 densidade ótica (DO) em espectrofotômetro a 600nm.



239 Para determinar a adaptabilidade dos isolados a variação de temperatura, pH e  
240 concentrações de NaCl, foi avaliado o crescimento bacteriano em meio líquido NYD contido  
241 em tubos de ensaio, incubados em B.O.D. (Biochemistry Oxygen Demand, Piracicaba, SP,  
242 Brasil) nas temperaturas de 20, 25, 30, 35 e 40 °C; em níveis de pH ajustados para 5,0; 5,5;  
243 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 e 9,0; e no meio suplementado com NaCl nas concentrações de 1, 2,  
244 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 %. Alíquotas de 0,5 mL das suspensões bacterianas ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) foram  
245 depositadas em tubos de ensaio contendo 4,5 mL dos meios. No estudo do efeito dos níveis de  
246 pH e concentrações de NaCl, os tubos foram incubados a 29 °C. O delineamento experimental  
247 em cada ensaio foi inteiramente casualizado com três repetições, sendo cada repetição  
248 constituída por um tubo de ensaio. Após 48 h de incubação, o crescimento bacteriano foi  
249 avaliado pela leitura da DO em espectrofotômetro a 570 nm.

250 A reação de hipersensibilidade foi determinada em folhas de fumo (cv. Rapé Folhice)  
251 e tomateiro (cv. Santa Cruz), segundo metodologia de Schaad et al. (2001). O delineamento  
252 experimental foi inteiramente casualizado com dez repetições por isolado, sendo a unidade  
253 experimental constituída por um ponto de inoculação.

254 Placas de microtitulação de 96 poços (Costar 3599 Corning Inc., Amsterdam, USA)  
255 foram utilizadas para avaliar a produção de biofilme de acordo com protocolo adaptado de  
256 Trentin et al. (2011). Em cada poço foi colocado 140 µL de meio líquido NYD, 20 µL de água  
257 Milli-Q e 40 µL da suspensão bacteriana ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>). Como controle negativo foi  
258 utilizado apenas o meio de cultura. Após 36 h de incubação ( $28 \pm 2^\circ$  C) o conteúdo das placas  
259 foi removido e lavado três vezes com 200 µL de NaCl a 0,9 %. As placas foram incubadas  
260 em estufa a 60 °C por 1 h. Em seguida, foi adicionado 200 µL de cristal violeta a 0,4 % em  
261 cada poço. Após 15 min à temperatura ambiente, as placas foram lavadas com ADE. O  
262 biofilme foi solubilizado em 200 µL de etanol (99,5%) durante 10 minutos, com a tampa  
263 fechada para evitar a evaporação, e a DO foi medida a 570 nm (Spectramax M2 multimodo  
264 Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, USA).

265 Os isolados de *X. campestris* pv. *viticola* foram classificados pela sua habilidade para  
266 produzir biofilme de acordo com Stepanović et al. (2000). Nessa classificação, a DO do  
267 controle negativo (DOc) é usada como parâmetro para classificar a DO do isolado (DOi) em  
268 diferentes níveis de produção de biofilme. Portanto, a classificação segue a regra:  $DOi \leq DOc$   
269 = não produtor de biofilme;  $DOc < DOi \leq 2 \times DOc$  = fraco produtor de biofilme;  $2 \times DOc <$   
270  $DOi \leq 4 \times DOc$  = moderado produtor de biofilme;  $4 \times DOc < DOi$  = forte produtor de  
271 biofilme. Os resultados foram calculados utilizando oito réplicas biológicas.

272 Para as variáveis temperatura, pH, concentração de NaCl e produção de biofilme, as  
273 diferenças entre os isolados de *X. campestris* pv. *viticola* sensíveis e tolerantes ao cobre foram  
274 determinados pelo teste t-Student ( $P \leq 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas com o  
275 programa Statistix v. 9.0.

276

## 277 **Resultados**

278

### 279 **Sensibilidade ao cobre *in vitro***

280 Diferenças foram observadas na resposta de sensibilidade de 70 isolados de *X.*  
281 *campestris* pv. *viticola* ao cobre. A maior sensibilidade dos isolados aos produtos hidróxido e  
282 oxiclureto de cobre ocorreu, respectivamente, nas concentrações de  $70 \mu\text{g mL}^{-1} \text{Cu}^{2+}$  (61 % dos  
283 isolados) e  $60 \mu\text{g mL}^{-1} \text{Cu}^{2+}$  (41 % dos isolados). Os isolados foram mais sensíveis ao  
284 oxiclureto de cobre, com 27 % não crescendo na mais baixa concentração testada ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$   
285  $\text{Cu}^{2+}$ ). O isolado tipo (NCPB 2475) foi o único sensível a  $10 \mu\text{g mL}^{-1} \text{Cu}^{2+}$  dos dois  
286 produtos. Todos os isolados foram sensíveis às concentrações de cobre superiores a  $140 \mu\text{g}$   
287  $\text{mL}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ . Os isolados foram separados em dois grupos de reação fenotípica ao cobre, como  
288 sensíveis e tolerantes. Foram classificados como tolerantes ao hidróxido de cobre os 23  
289 isolados (33 %) que tiveram o crescimento inibido apenas na concentração de  $140 \mu\text{g mL}^{-1}$   
290  $\text{Cu}^{2+}$ . Já com relação ao oxiclureto de cobre, os tolerantes foram os 21 isolados (30 %) que  
291 foram inibidos apenas nas concentrações de 70 ou  $140 \mu\text{g mL}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ . Não foi observada  
292 correlação entre ano de coleta do isolado com a tolerância ao cobre. Dentre os 70 isolados  
293 estudados, foram selecionados dez isolados de cada fenótipo tolerante e sensível ao cobre para  
294 os ensaios subsequentes (Tabela 1).

295

### 296 **Sensibilidade ao cobre *in vivo***

297 A eficácia dos cúpricos em interferir nos componentes epidemiológicos do cancro  
298 bacteriano da videira variou de acordo com o nível de sensibilidade dos isolados de *X.*  
299 *campestris* pv. *viticola*. Todos os isolados causaram sintomas do cancro bacteriano nas folhas  
300 de plantas de videira previamente pulverizadas com cobre, com incidência de 100 %. No  
301 entanto, diferenças ( $P \leq 0,05$ ) foram observadas no período de incubação da doença entre os  
302 isolados sensíveis e tolerantes, com valores médios respectivamente de 10,7 e 6,3 dias para  
303 hidróxido de cobre e de 10,3 e 7 dias para oxiclureto de cobre.

304

### 305 **Análise dos genes *copA* e *copB* em isolados sensíveis e tolerantes ao cobre**

306 Foram amplificados fragmentos de 870 pb e 531 pb, dos genes *copA* e *copB*,  
307 respectivamente, a partir do DNA dos isolados de *X. campestris* pv. *viticola*. A amplificação  
308 dos fragmentos por PCR revelou que os genes *copA* e *copB* estavam presentes em isolados  
309 sensíveis e resistentes.

310 O alinhamento das sequências pertencentes aos genes *copA* e *copB* revelaram alta  
311 similaridade para os isolados de *X. campestris* pv. *viticola* sensíveis e tolerantes ao cobre,  
312 indicando assim uma ausência de diferença entre os dois fenótipos quando comparados.

313 Os resultados obtidos através da análise de divergência genética indicaram alta  
314 similaridade entre os isolados sensíveis e tolerantes para os genes *copA* e *copB*. Os valores do  
315 índice de fixação haplotípica ( $F_{st}$ ), Dxy e Da não foram significativos (Tabela 2).

316 Os valores obtidos nas análises de diversidade genética para o gene *copA* permitiram  
317 observar que os isolados pertencentes ao grupo dos sensíveis ao cobre apresentaram um valor  
318 superior de diversidade nucleotídica e haplotípica quando comparados aos indivíduos das  
319 populações tolerantes (Tabela 3). Constatou-se a existência de cinco combinações de alelos  
320 que se segregaram conjuntamente, distribuídos entre os isolados sensíveis e tolerantes, com  
321 uma diferenciação significativa no número de haplótipos (Tabela 3, Figura 1A). Por  
322 intermédio da rede de haplótipos foi possível constatar que o haplótipo H1 foi o mais  
323 frequente, sendo este compartilhado por seis isolados sensíveis e nove tolerantes (Figura 1A).

324 Os valores obtidos de diversidade nucleotídica e haplotípica para o gene *copB*  
325 permitiu observar que não houve diferença entre os isolados de *X. campestris* pv. *viticola*  
326 sensíveis e tolerantes ao cobre (Tabela 3). Através da rede de haplótipos foi possível constatar  
327 que o haplótipo H1 foi o mais compartilhado entre os isolados, sendo este composto por seis  
328 isolados sensíveis e nove tolerantes ao cobre (Figura 1B).

329 A partir das 19 sequências do gene *copA* obtidas através dos isolados de *X. campestris*  
330 pv. *viticola* do Submédio do Vale do São Francisco foi realizada a comparação das variáveis  
331 de diversidade genética desta espécie com outras espécies do gênero *Xanthomonas* coletadas  
332 no GenBank (*X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*, *X. citri* subsp. *citri*, *X. vesicatoria*, *X.*  
333 *euvesicatoria* e *X. arboricola* pv. *juglandis*). As análises de diversidade genética identificaram  
334 uma baixa diversidade nucleotídica e haplotípica de *X. campestris* pv. *viticola* em relação as  
335 outras espécies, com uma pequena variação no número de haplótipos entre elas (Tabela 4). Na  
336 rede de haplótipos constatou-se a existência de 15 haplótipos, distribuídos entre as espécies de  
337 gênero *Xanthomonas* (Figura 2). O maior número de haplótipos foi encontrado em *X.*  
338 *euvesicatoria* e *X. campestris* pv. *viticola* com seis e cinco haplótipos, respectivamente. Os

339 haplótipos mais frequentes foram o H1, compartilhado apenas por 15 isolados de *X.*  
340 *campestris* pv. *viticola*, e o H7, contendo representantes das demais espécies.

341 Na análise comparativa de *X. campestris* pv. *viticola* com as outras espécies de  
342 *Xanthomonas*, observou-se ausência de sítios polimórficos entre as espécies *X. alfalfae* subsp.  
343 *citrumelonis*, *X. citri* subsp. *citri* e *X. arboricola* pv. *juglandis* (Tabela 5). O índice de fixação  
344 haplotípica ( $F_{st}$ ) foi baixo para a maior parte das espécies analisadas. Os valores de  $D_{xy}$  e  $D_a$   
345 foram não significativos, e o número de sítios compartilhados (Ss) entre algumas das espécies  
346 analisadas foi considerado elevado.

347

### 348 **Componentes de adaptabilidade de isolados sensíveis e tolerantes ao cobre**

349 Sete componentes de adaptabilidade foram mensurados para 20 isolados de *X.*  
350 *campestris* pv. *viticola* dos dois fenótipos de reação ao cobre. No estudo de características  
351 morfológicas em meio NYDA, variações foram observadas na colônia, com coloração  
352 esbranquiçada ou creme e bordos lisos ou rugosos. No entanto, essas diferenças foram  
353 encontradas tanto nos isolados sensíveis quanto nos tolerantes, que também apresentaram  
354 similaridade no crescimento em meio líquido.

355 Diferenças ( $P \leq 0,05$ ) foram observadas entre os isolados sensíveis e tolerantes ao cobre  
356 em relação à temperatura, pH e concentração de NaCl (Figura 3). Os isolados tolerantes  
357 apresentaram melhor adaptabilidade em todas as temperaturas testadas (20, 25, 30, 35 e 40  
358 °C) (Figura 3A), aos níveis de pH de 6,0 a 7,5 (Figura 3B) e concentrações de NaCl de 2 a 5  
359 % (Figura 3C).

360 Não houve diferença entre os isolados sensíveis e tolerantes na indução de reação de  
361 hipersensibilidade em plantas de tomateiro, 24 h após a realização do teste. Em plantas de  
362 fumo o teste foi negativo.

363 Todos os isolados de *X. campestris* pv. *viticola* também produziram biofilme no meio  
364 NYD, sendo classificados em fraco, moderado e forte, porém sem diferença ( $P \leq 0,05$ ) entre  
365 isolados sensíveis e tolerantes.

366

### 367 **Discussão**

368

369 Este é o primeiro estudo sobre sensibilidade de um grande número de isolados de *X.*  
370 *campestris* pv. *viticola* oriundos do Submédio do Vale do São Francisco ao cobre, uma vez  
371 que o estudo realizado previamente utilizou apenas 21 isolados (Marques et al., 2009). Até o

372 momento, também pouco se sabe sobre o papel dos genes *copA* e *copB* na resistência ao cobre  
373 e sobre o efeito da tolerância ao cobre nos componentes de adaptabilidade desta espécie de  
374 bactéria.

375 Os produtos hidróxido e oxiclureto de cobre não são registrados para controle do  
376 cancro bacteriano em videira, porém, têm registro destes produtos para o controle de doenças  
377 fúngicas como míldio, antracnose, podridão da uva madura, mancha foliar e podridão amarga  
378 (Agrofit, 2014), por este motivo, são também utilizados para o manejo desta doença em  
379 campo ao longo dos anos como medida de proteção de parreirais do Vale do Submédio São  
380 Francisco. O cobre atua na proteção do tecido vegetal contra infecção por bactérias e na  
381 redução da população bacteriana na superfície foliar. São necessárias várias aplicações de  
382 cúpricos para alcançar controle adequado de fitobacterioses, e o uso prolongado desses  
383 produtos pode levar ao surgimento de isolados resistentes ao cobre.

384 Houve variação na sensibilidade ao cobre em isolados brasileiros de *X. campestris* pv.  
385 *viticola*. Testes de sensibilidade *in vitro* revelaram que a maioria dos isolados foi sensível ao  
386 hidróxido e ao oxiclureto de cobre nas concentrações de 10 a 70  $\mu\text{g mL}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ , principalmente  
387 ao segundo produto, com 27 % não crescendo na menor concentração testada (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$   
388  $\text{Cu}^{2+}$ ). No entanto, foi detectada uma presença expressiva de isolados tolerantes,  
389 principalmente ao hidróxido de cobre na concentração de 70  $\mu\text{g mL}^{-1} \text{Cu}^{2+}$  (33 % dos  
390 isolados). Estudo prévio realizado com 21 isolados de *X. campestris* pv. *viticola* do Submédio  
391 do Vale do São Francisco evidenciou variação na sensibilidade dos isolados ao sulfato e  
392 hidróxido de cobre em concentração mínima inibitória variando entre 10 e 60  $\mu\text{g mL}^{-1} \text{Cu}^{2+}$   
393 (Marques et al., 2009). Na ocasião foi observada uma tendência de aumento na tolerância ao  
394 cobre ao longo dos anos 1998 a 2006, que não foi evidenciada no presente estudo. No entanto,  
395 a divergência entre as duas pesquisas pode ser explicada pela diferença da origem dos  
396 isolados, os quais foram de áreas distintas e oriundos de parreirais com diferentes épocas de  
397 implantação e emprego de diferentes doses e frequências de aplicações de cúpricos.

398 O aumento na tolerância ao cobre com o tempo tem sido observado em outras  
399 fitobactérias de importância agrícola do gênero *Xanthomonas*, como *X. euvesicatoria* (Marco  
400 et al., 1983; Stall et al., 1986; Behlau et al., 2013), *X. arboricola* pv. *juglandis* (Lee et al.,  
401 1994; Behlau et al., 2013), *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* (Schaad et al., 2005; Schaad et al.,  
402 2006), *X. citri* subsp. *citri* (Behlau et al., 2013) e *X. campestris* pv. *campestris* (Lugo et al.,  
403 2013).

404 A alta sensibilidade do patótipo de *X. campestris* pv. *viticola* (NCPFB 2475) ao cobre  
405 também havia sido observada por Marques et al. (2009), e portanto, já era esperada. Esse

406 isolado foi coletado em 1972 na Índia, sendo possível que naquela época ainda não fossem  
407 utilizados compostos cúpricos para o controle do cancro bacteriano da videira. No entanto, a  
408 detecção de isolados de *X. campestris* pv. *viticola* de 1998 tolerantes ao cobre, mesmo ano em  
409 que a doença foi detectada no Brasil, pode ser explicada pelo fato do cancro bacteriano ter  
410 sido introduzido no país a partir de material propagativo trazido da Índia (Trindade et al.,  
411 2005), onde isolados resistentes ao cobre já haviam sido então relatados (Chand et al. 1994).

412 O teste de sensibilidade *in vivo* ao cobre explorou a relevância da presença no campo  
413 de isolados com diferentes níveis de sensibilidade e a eficácia de hidróxido e oxicloreto de  
414 cobre em controlar o cancro bacteriano em dosagem comercial dos produtos. Os resultados  
415 revelaram a baixa eficácia dos produtos sobre os isolados tolerantes, que tiveram o período de  
416 incubação, um dos principais componentes epidemiológicos da doença, reduzido em média de  
417 4 e 3 dias, para hidróxido e oxicloreto de cobre, respectivamente, em relação aos isolados  
418 sensíveis. Isso tem uma implicação prática, uma vez que a eficiência da aplicação de cúpricos  
419 no controle da doença deverá diminuir em função da existência de isolados tolerantes nas  
420 áreas agrícolas, e estas populações deverão aumentar com a transferência horizontal de genes  
421 de resistência pela conjugação genética, dificultando cada vez mais o manejo da doença.

422 O cobre é essencial para várias enzimas envolvidas na respiração, mas acima de certa  
423 concentração tem a habilidade de gerar radicais livres capazes de danificar o DNA e  
424 membranas lipídicas, sendo tóxico às células. Para evitar danos, o seu nível intracelular deve  
425 ser controlado, e para isso, as bactérias desenvolveram sistemas para se protegerem da  
426 concentração excessiva de cobre (Voloudakis et al., 2005). Para sobreviver em um ambiente  
427 com alta concentração desse metal a bactéria pode ativar mecanismos reguladores  
428 relacionados à aquisição de genes de resistência. Os genes associados à resistência ao cobre  
429 em bactérias fitopatogênicas estão localizados principalmente em plasmídeos, o que facilita a  
430 sua circulação entre diferentes espécies bacterianas e transferência para isolados sensíveis  
431 através do processo de conjugação (Voloudakis et al., 1993; Behlau et al., 2012; Behlau et al.,  
432 2013).

433 Os resultados da reação de PCR comprovaram que os genes *copA* e *copB* estão  
434 expandidos e estabelecidos na população de *X. campestris* pv. *viticola* sensível e tolerante ao  
435 cobre, uma vez que foi possível obter amplificação positiva com os *primers copAF/copAR* e  
436 *copBF/copBR*, inclusive para o isolado que foi sensível a  $10 \mu\text{g mL}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ , a mais baixa  
437 concentração de cobre testada. Não foi verificada a ocorrência de mutação específica nos  
438 genes *copA* e *copB* para resistência ou suscetibilidade que explicasse o comportamento da  
439 população estudada em relação ao cobre. Marques (2007) também havia detectado a

440 ocorrência do gene *copA* em isolados de *X. campestris* pv. *viticola* sensíveis e tolerantes ao  
441 cobre, sendo sugerido que o gene estava amplamente difundido nesse patovar, o que também  
442 foi confirmado nesse estudo em relação ao gene *copB*, até então inexplorado para essa  
443 bactéria. Da mesma forma, tanto isolados sensíveis quanto tolerantes ao cobre em *P. syringae*  
444 de manga carregavam plasmídeos homólogos ao *copABCD* (Cazorla et al., 2002). Esses  
445 resultados evidenciam que os genes estudados não são expressos na resistência ao cobre em *X.*  
446 *campestris* pv. *viticola*, embora estejam envolvidos nos mecanismos de resistência a *X. citri*  
447 subsp. *citri* em citrus (Behlau et al., 2011).

448 As análises revelaram que existe alto grau de similaridade genética entre isolados de  
449 *X. campestris* pv. *viticola* sensíveis e tolerantes ao cobre em relação a cada um dos genes  
450 *copA* e *copB*, cujos índices refletem o baixo nível de divergência genética existente entre os  
451 isolados. Na análise da sequência do gene *copA*, a maior parte dos haplótipos (4 haplótipos)  
452 foi observada nos isolados sensíveis, demonstrando assim o maior nível de diferenciação  
453 genética deste grupo. Por outro lado, os valores de diversidade genética observados para o  
454 gene *copB* não foram significativos para os isolados de *X. campestris* pv. *viticola*. Contudo, os  
455 dois genes mostraram-se pouco diversos na rede de haplótipos, indicando uma baixa  
456 diversidade genética entre os isolados desta localidade.

457 O gene *copA* é o gene de resistência ao cobre mais conservado entre espécies do  
458 gênero *Xanthomonas* (Behlau et al., 2013). Por isso, este gene foi escolhido para avaliar a  
459 relação de *X. campestris* pv. *viticola* com outras espécies do gênero. Apesar disto, o gene não  
460 se mostrou eficiente na distinção das relações filogenéticas das espécies avaliadas neste  
461 estudo, sugerindo que este marcador molecular não é capaz de distinguir espécies  
462 pertencentes a este gênero. Em estudo realizado anteriormente, foi observado uma maior  
463 distância genética entre *X. campestris* pv. *viticola* quando comparadas com *X. oryzae* pv.  
464 *oryzae* e *X. campestris* pv. *campestris* e maior proximidade com *X. citri* subsp. *citri* (Marques,  
465 2007). Segundo esse autor, este fato pode ser um indicativo de maior afinidade de *X.*  
466 *campestris* pv. *viticola* com a espécie *X. citri* do que com *X. campestris*, o que foi observado  
467 na presente pesquisa também em relação a *X. citri* subsp. *citri*, além de elevada similaridade  
468 genética compartilhada com *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* e *X. arboricola* pv. *juglandis*.

469 Baseado em análises realizadas com os genes *copA* e *copB*, diversos estudos  
470 mostraram a relação filogenética entre isolados de *Xanthomonas* spp., a exemplo de *X.*  
471 *alfalfae* subsp. *citrumelonis* e *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, com semelhanças superiores a 92  
472 % (Voloudakis et al., 2005; Behlau et al., 2011). Apesar da baixa diversidade genética, a rede  
473 de haplótipos mostrou que os isolados de *X. campestris* pv. *viticola* não compartilham

474 haplótipos com as outras espécies. A alta similaridade dos genes entre as espécies indica que a  
475 resistência ao cobre em *Xanthomonas* tem uma origem comum, e a pequena diferença na  
476 sequência de nucleotídeos dentro dos grupos de isolados sugere que os genes de resistência ao  
477 cobre têm sido independentemente trocados entre espécies de *Xanthomonas* ao redor do  
478 mundo (Behlau et al., 2013).

479 Isolados com resistência ao cobre possivelmente foram introduzidos no Brasil, no  
480 Submético do vale do São Francisco, através de material propagativo infectado trazido da  
481 Índia, e a transferência horizontal de genes por conjugação é provavelmente o mecanismo  
482 pelo qual os genes de resistência ao cobre estão sendo adquiridos em indivíduos de *X.*  
483 *campestris* pv. *viticola* em decorrência da pressão da aplicação de cobre nos campos, como  
484 demonstrado em outras *Xanthomonas* (Stall et al., 1986; Bender et al.; 1990; Cooksey, 1990;  
485 Behlau et al., 2012).

486 Embora a ocorrência de resistência ao cobre tenha sido anteriormente relatada em  
487 isolados de *X. campestris* pv. *viticola* (Chand et al., 1994; Marques et al., 2009) o custo  
488 biológico da resistência ao cobre não foi investigado. Informações sobre os componentes de  
489 adaptabilidade de bactérias sensíveis e tolerantes ao cobre podem ser úteis para evitar o  
490 desenvolvimento da resistência e aperfeiçoar as estratégias de manejo da doença. Alguns  
491 estudos têm mostrado que isolados patogênicos que adquiriram resistência a um agente  
492 químico podem ter sua competitividade reduzida na ausência do produto. O custo de  
493 adaptabilidade em procariontes é principalmente estudado em bactérias da área médica e  
494 ambiental e em relação a antibióticos, com alterações nas características fenotípicas e  
495 fisiológicas (Anderson, 2006; Kang and Park, 2010) e poucas pesquisas têm sido  
496 desenvolvidas com bactérias fitopatogênicas. Na ausência de sulfato de cobre, isolados de *X.*  
497 *perforans* resistentes foram menos agressivos a plantas de tomateiro do que os sensíveis,  
498 indicando redução de adaptabilidade na ausência do produto (Araújo et al., 2012). Este fato  
499 não foi constatado para *X. campestris* pv. *viticola*, e já havia sido demonstrado para isolados  
500 de Oomycetes patogênicos a plantas que adquiriam resistência a um agente químico e podem  
501 não sofrer redução de competitividade quando comparados com isolados sensíveis na  
502 ausência do produto (Hu et al., 2008; Corio-Costet et al., 2011).

503 Os isolados de *X. campestris* pv. *viticola* tolerantes ao cobre não tiveram sua  
504 adaptabilidade reduzida em relação aos isolados sensíveis na ausência de hidróxido e  
505 oxicloreto de cobre, ou seja, a tolerância ao cobre não teve um efeito pleiotrópico. Pelo  
506 contrário, tiveram melhor adaptabilidade do que os sensíveis nas temperaturas de 20 a 40 °C,  
507 pH de 6,0 a 7,5 e concentrações de NaCl de 2 a 5 %. Comportaram-se de forma semelhante



508 aos sensíveis quanto à capacidade de induzir reação de hipersensibilidade em plantas de  
509 tomateiro, nas características culturais e crescimento em meio de cultura. A ausência de custo  
510 de adaptabilidade é preocupante, possibilitará a manutenção da população tolerante ao cobre  
511 no campo e no material propagativo, em alta população e por longos períodos favorecendo a  
512 disseminação desses isolados.

513 Os isolados tolerantes também não perderam a capacidade de formar biofilme, sendo  
514 mantido um componente importante de adaptabilidade, uma vez que o biofilme favorece a  
515 sobrevivência e proteção de bactérias na planta, inclusive aos produtos químicos durante o  
516 processo de infecção (Boles et al., 2004; Rigano et al., 2007). Além disso, o biofilme pode  
517 desempenhar um papel importante no processo de conjugação de genes de resistência em  
518 bactérias na planta (Rigano et al., 2007), favorecendo o aumento da população tolerante. Para  
519 *X. citri* subsp. *citri* a formação de biofilme não foi um fator importante no processo de  
520 conjugação (Behlau et al., 2012), mas para *X. campestris* pv. *viticola* a probabilidade de  
521 transferência horizontal de resistência em populações em plantas de videira no biofilme ainda  
522 precisa ser investigada.

523 Atualmente, o manejo fitossanitário do agente causal do cancro bacteriano da videira  
524 no Vale do Submédio São Francisco é realizado por meio de fungicidas cúpricos, afetando  
525 negativamente o ambiente e comprometendo a competitividade e a sustentabilidade da  
526 cultura. Além disso, o uso indiscriminado de produtos cúpricos, tem resultado na seleção de  
527 populações do patógeno tolerantes ao cobre, o que foi claramente evidenciado na presente  
528 pesquisa. Dessa forma, a utilização de cúpricos no manejo do cancro bacteriano da videira  
529 nessa região deve ser integrada a outras medidas de controle, visando prevenir a prevalência  
530 de indivíduos tolerantes ao cobre, uma vez que estes mostraram ter uma boa adaptabilidade na  
531 ausência de cobre e uma maior agressividade em plantas pulverizadas com os cúpricos.

532

### 533 **Agradecimentos**

534

535 Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e  
536 Tecnológico (CNPq) pelo auxílio à Pesquisa (APQ 477521/2011-8) e bolsa de produtividade  
537 a E. B. Souza (Proc. 307348/2011-3).

538

### 539 **Referências**

540

541 Agrofit - Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários. Fungicidas registrados para a cultura da  
542 uva. 2014. Disponível em: <[www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)> [Acessado Jan 16, 2017]

- 543 Anderson, D.I. 2006. The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical  
544 conclusions? *Current Opinion in Microbiology* 9: 461-465.
- 545 Araújo, E.R.; Pereira, R.C.; Ferreira, M.A.S.V.; Quezado-Durval, A.M.; Café-Filho, A.C.  
546 2012. Sensitivity of *Xanthomonas* causing tomato bacterial spot to copper and  
547 streptomycin and *in vivo* infra-specific competitive ability in *Xanthomonas perforans*  
548 resistant and sensitive to copper. *Journal of Plant Pathology* 94: 79-87.
- 549 Bandelt, H-J.; Forster, P.; Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific  
550 phylogenies. *Molecular Biology Evolution* 16: 37-48.
- 551 Behlau, F.; Canteros, B.I.; Minsavage, G.V.; Jones, J.B.; Graham, J.H. 2011. Molecular  
552 characterization of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and  
553 *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*. *Applied and Environmental Microbiology* 77:  
554 4089-4096.
- 555 Behlau, F.; Hong, J.C.; Jones, J.B.; Graham, J.H. 2013. Evidence for acquisition of copper  
556 resistance genes from different sources in citrus-associated *Xanthomonads*.  
557 *Phytopathology* 103: 409-418.
- 558 Behlau, F.; Jones, J.B.; Myers, M.E.; Graham, J.H. 2012. Monitoring for resistant  
559 populations of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and epiphytic bacteria on citrus trees treated  
560 with copper or streptomycin using a new semi-selective medium. *European Journal of*  
561 *Plant Pathology* 132: 259-270.
- 562 Bender, C.L.; Malvick, D.K.; Conway, K.E.; George, S.; Pratt, P. 1990. Characterization of  
563 pXV10A, a copper resistance plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Applied*  
564 *and Environmental Microbiology* 56: 170-175.
- 565 Boles, B.R.; Thoendel, M.; Singh, P.K. 2004. Self-generated diversity produces “insurance  
566 effects” in biofilm communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*  
567 *United States of America* 101: 16630-16635.
- 568 Cazorla, F.M.; Arrebola, E.; Sesma, A.; Pérez-García, A.; Codina, J.C.; Murilo, J.; Vicente,  
569 A. 2002. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* strains isolated from mango is  
570 encoded mainly by plasmids. *Phytopathology* 92: 909-916.
- 571 Chand, R.; Singh, P.N.; Singh, R. 1994. Copper and streptomycin resistance in *Xanthomonas*  
572 *campestris* pv. *viticola*. *Zeitschrift fuer Pflanzenkheiten und Planzenschutz* 101: 487-491.
- 573 Cooksey, D.A. 1987. Characterization of a copper resistance plasmid conserved in copper-  
574 resistant strains of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Applied and Environmental*  
575 *Microbiology* 53: 454- 456.

- 576 Cooksey, D.A. 1990. Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. Annual  
577 Review Phytopathology 28: 201-219.
- 578 Corio-Costet, M.F.; Dufour, M.C.; Cigna, J.; Abadie, P.; Chen, W.J. 2011. Diversity and  
579 fitness of *Plasmopara viticola* isolates resistant to QoI fungicides. European Journal of  
580 Plant Pathology 129: 315-329.
- 581 Excoffier, L.; Lischer, H.E.L. 2010. Arlequin suite version 3.5: A new series of programs to  
582 perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology  
583 Resources. 10: 564-567.
- 584 Gama, M.A.S. 2014. Caracterização polifásica de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e  
585 reposição de espécies de *Xanthomonas* patogênicas à videira e cajueiro. 138 f. Tese  
586 (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- 587 Hu, J.H.; Hong, C.X.; Stromberg, E.L.; Moorman, G.W. 2008. Mefenoxam sensitivity and  
588 fitness analysis of *Phytophthora nicotianae* isolates from nurseries in Virginia, USA. Plant  
589 Pathology 57: 728-736.
- 590 Mapa - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2013. Instrução Normativa  
591 SDA Nº 59. Lista de Pragas Quarentenárias Presentes. Disponível em:  
592 [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br) [Acessado Jan 07, 2017]
- 593 Kang, Y.S.; Park, W. 2010. Trade-off between antibiotic resistance and biological fitness in  
594 *Acinetobacter* sp. strain DR1. Environmental Microbiology 12: 1304-1318.
- 595 Lee, Y.A.; Hendson, M.; Panopoulos, N.J.; Schroth, M.N. 1994. Molecular cloning,  
596 chromosomal mapping, and sequence analysis of copper resistance genes from  
597 *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*: homology with small blue copper proteins and  
598 multicopper oxidase. Journal of Bacteriology 176: 173-188.
- 599 Lugo, A.J.; Elibox, W.; Jones, J.B.; Ramsuhag, A. 2013. Copper resistance in *Xanthomonas*  
600 *campestris* pv. *campestris* affecting crucifers in Trinidad. European Journal of Plant  
601 Pathology 136: 61-70.
- 602 Ma, Z.; Michailides, T.J. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of  
603 fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic  
604 fungi. Crop Protection 24: 853-863.
- 605 Marco, G.M.; Stall, R.E. 1983. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of  
606 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. Plant Disease  
607 67: 779-781.

- 608 Marques, E. 2007. Variabilidade e tolerância ao cobre em *Xanthomonas campestris* pv.  
609 *viticola*, agente causal do cancro bacteriano da videira (*Vitis* spp.).129 f. Dissertação  
610 (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília.
- 611 Marques, E.; Uesugi, C.H.; Ferreira, M.A.S.V. 2009. Sensitivity to copper in *Xanthomonas*  
612 *campestris* pv. *viticola*. Tropical Plant Pathology 34: 406-411.
- 613 Pohronezny, K.; Sommerfeld, M.; Raid, R.N. 1992. Streptomycin resistance and copper  
614 tolerance among strain of *Pseudomonas cichorii* in commercial celery seedbeds.  
615 Phytopathology 82: 1118. 1992.
- 616 Potinis, N.; Krasileva, K.; Chow, V.; Almeida, N.F.; Patil, P.; Ryan, R.; Sharlach, M.;  
617 Behlau, F.; Dow, J.M.; White, F.; Preston, J.; Vinatzer, B.; Koebnik, R.; Setubal, J.C.;  
618 Norman, D.J.; Stakawicz, B.; Jones, J.B. 2011. Comparative genomics reveals diversity  
619 among xanthomonads infecting tomato and pepper. BMC Genomics 12: 146.
- 620 Pusey, P.L.; Wilson, C.L. 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by  
621 *Bacillus subtilis*. Plant Disease 68: 753-756.
- 622 Rigano, L.A.; Siciliano, F.; Enrique, R.; Sendin, L.; Filippone, P.; Torres, P.; Guesta, J.;  
623 Dow, J.; Castagnaro, A.; Vojnov, A. 2007. Biofilm formation, epiphytic fitness, and  
624 canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Molecular Plant-Microbe  
625 Interactions 20: 1222-1230.
- 626 Rozas, J.; Sánchez-Delbarrio J.C.; Messeguer, X. 2003. DnaSP, DNA polymorphism  
627 analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics 19: 2496-2497.
- 628 Shaad, N.W.; Jones, J.B.; Chun, W. (Eds.). 2001. Laboratory guide for identification of plant  
629 pathogenic bacteria. 3<sup>a</sup> Ed., APS: St Paul.
- 630 Shaad, N.W.; Postnikova, E.; Lacy, G. H.; Sechler, A.; Agarkova, I.; Stromberg, P. E.;  
631 Stromberg, V. K.; Vidaver, A. K. 2005. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv.  
632 *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse)  
633 sp nov nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp nov nom.  
634 rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989  
635 sp nov nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as  
636 *X. smithii* subsp. *smithii* nov comb. nov nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and  
637 Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp nov nom.  
638 rev.; and “var. *fuscans*” of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X.*  
639 *fuscans* subsp. *fuscans* sp nov. Systematic and Applied Microbiology 28:494–518.

- 640 Schaad, N.W.; Postnikova, E.; Lacy, G.; Secher, A.; Agarkova, I.; Stromberg, P.E.;  
641 Stromberg, V.K.; Vidaver, A.K. 2006. Emended classification of xanthomonad pathogens  
642 on citrus. *Systematic and Applied Microbiology* 29: 690-695.
- 643 Staden, R.; Beal, K.F.; Bonfield, J.D. 1998. The Staden Package, 132: 115-130. In: Misener,  
644 S.; Krawetz, S.A. (Eds.). *Computer Methods in Molecular Biology*. The Humana Press Inc,  
645 Totowa, NJ, USA.
- 646 Stall, R.E.; Loschke, D.C.; Jones, J.B. 1986. Linkage of copper resistance and avirulence loci  
647 on a sel-transmissible plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology*  
648 76: 240-243.
- 649 Stepanovic, S.; Vukovic, D.; Dakic, I.; Savic, B.; Svabic-Vlahovic, M. 2000. A modified  
650 microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of*  
651 *Microbiological Methods* 40: 175-179.
- 652 Sundin, G.W.; Jones, A.L.; Fulbright, D.W. 1989. Copper resistance in *Pseudomonas*  
653 *syringae* pv. *syringae* from cherry orchards and its associated transfer in vitro and in plant  
654 with a plasmid. *Phytopathology* 79: 861-865.
- 655 Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. 2011. MEGA5: molecular  
656 evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and  
657 maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- 658 Trentin, D.S.; Gorziza, D.F.; Abraham, W.R. 2011. Antibiofilm activity of *Cobetia marina*  
659 filtrate upon *Staphylococcus epidermidis* catheter-related isolates. *Brazilian Journal of*  
660 *Microbiology* 42: 1329-1333.
- 661 Trindade, L.C.; Lima, M.F.; Ferreira, M.A.S.V. 2005. Molecular characterization of Brazilian  
662 strains of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Fitopatologia Brasileira* 30: 46-54.
- 663 Voloudakis, A.E.; Reignier, T.M.; Cooksey, D.A. 1993. Regulation of resistance to copper in  
664 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. *Applied and Environmental Microbiology* 59:  
665 1627-1634.
- 666 Voloudakis, A.E.; Reignier, T.M.; Cooksey, D.A. 2005. Regulation of resistance to copper in  
667 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. *Applied and Environmental Microbiology* 71:  
668 782-789.
- 669
- 670

671 Tabela 1- Perfil de sensibilidade ao cobre de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*  
 672 classificados como sensíveis (1 a 10) e tolerantes (11 a 20), avaliado pelo crescimento *in vitro*  
 673 em meio MMCC (meio mínimo complexando cobre).

<b>Ordem</b>	<b>Isolado</b>	<b>Ano de Coleta</b>	<b>Cultivar de videira</b>	<b>Origem</b>	<b>Oxicloreto de cobre (µg mL Cu<sup>2+</sup>)</b>	<b>Hidróxido de cobre (µg mL Cu<sup>2+</sup>)</b>
1	NCPPB 2475	1972	Anab-e- Shahi	Índia	10	10
2	Xcv 15	2009	Festival	Petrolina – PE	70	10
3	Xcv 52	2009	Red Globe	Casa Nova – BA	70	10
4	Xcv 79	2009	Red Globe	Petrolina – PE	70	10
5	Xcv 80	2009	Festival	Petrolina – PE	70	10
6	Xcv 208	2011	Festival	Petrolina – PE	70	10
7	Xcv 230	2012	Red Globe	Casa Nova – BA	70	10
8	Xcv 235	2012	ND	Casa Nova – BA	30	10
9	P085/13-A	2013	Red Globe	Petrolina – PE	60	10
10	P129/14-A	2014	Red Globe	Petrolina – PE	70	10
11	Xcv 13	2009	Festival	Petrolina – PE	140	70
12	Xcv 54	2009	Festival	Casa Nova – BA	140	70
13	Xcv 116	2009	Thompson	Petrolina – PE	140	70
14	Xcv 117	2009	Red Globe	Petrolina – PE	140	70
15	Xcv 132	2010	Thompson	Casa Nova – BA	140	70
16	Xcv 154	2010	Red Globe	Casa Nova – BA	140	140
17	Xcv 181	2011	Red Globe	Juazeiro – BA	140	70
18	Xcv 191	2011	Thompson	Juazeiro – BA	140	70
19	Xcv 222	2012	Red Globe	Petrolina – PE	140	70
20	UnB 1183	1998	Red Globe	Petrolina – PE	140	70

674

675

676

677 Tabela 2 - Diferenciação genética entre isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*  
 678 sensíveis e tolerantes ao cobre, avaliada pelos genes *copA* e *copB*.

<b>População</b>	<b>Gene</b>	<b><math>F_{st}^1</math></b>	<b>Dxy</b>	<b>Da</b>	<b>Ss</b>	<b>Sf</b>
Sensível x tolerante	<i>copA</i>	0,01802	0,00100	0,00002	0	0
Sensível x tolerante	<i>copB</i>	0,00000	0,00053	0,00000	0	0

679 <sup>1</sup>  $F_{st}$ : índice de fixação haplotípica; Dxy: Número médios de substituições nucleotídicas por sítios entre os dois  
 680 grupos; Da: número líquido de substituições por sítios entre as populações; Ss: número de polimorfismos  
 681 compartilhados entre pares de população; Sf: número de diferenças fixas entre pares de populações.  
 682

683 Tabela 3 - Medida de diversidade genética para isolados de *Xanthomonas campestris* pv.  
 684 *viticola* sensíveis e tolerantes ao cobre, avaliada pelos genes *copA* e *copB*.

685

<b>População</b>	<b>N<sup>1</sup></b>	<b>Hd</b>	<b><math>\pi</math></b>	<b>NS</b>	<b>H</b>
<b><i>copA</i></b>					
Sensível	09	0,58333	0,00171	5	4
Tolerante	10	0,20000	0,00026	1	2
<b><i>copB</i></b>					
Sensível	07	0,28571	0,00062	1	2
Tolerante	10	0,20000	0,00043	1	2

686 <sup>1</sup>N: tamanho da amostra; Hd: diversidade haplotípica;  $\pi$ : diversidade nucleotídica; NS: número de sítios  
 687 polimórficos; h: haplótipo.

688

689

690

691



692 Tabela 4 - Medida de diversidade genética para bactérias do gênero *Xanthomonas*, avaliada  
 693 pelo gene *copA*.

<b>Bactéria</b>	<b>N<sup>1</sup></b>	<b>Hd</b>	<b><math>\pi</math></b>	<b>NS</b>	<b>H</b>
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i>	19	0,38596	0,00096	6	5
<i>X. alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i>	05	0,70000	0,02857	3	3
<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	04	0,50000	0,01180	18	2
<i>X. vesicatoria</i>	05	0,70000	0,01206	22	3
<i>X. euvesicatoria</i>	14	0,74725	0,02159	45	6
<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	02	1,00000	0,00131	1	2

694 <sup>1</sup>N: tamanho da amostra (isolados); Hd: diversidade haplotípica;  $\pi$ : diversidade nucleotídica; NS: número de  
 695 sítios polimórficos; h: haplótipo.

696

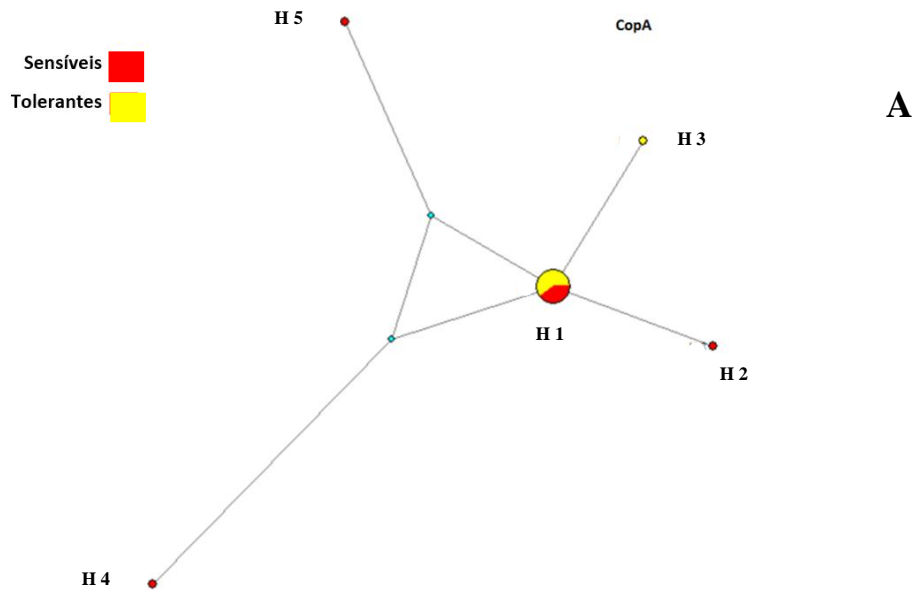
697 Tabela 5 - Diferenciação genética entre *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e espécies de  
 698 *Xanthomonas*, avaliada pelo gene *copA*.

<b>População<sup>1</sup></b>	<b><math>F_{st}</math><sup>2</sup></b>	<b>Dxy</b>	<b>Da</b>	<b>Ss</b>	<b>Sf</b>
<i>Xcv</i> x <i>Xac</i>	0,50176	0,02963	0,01487	0	0
<i>Xcv</i> x <i>Xcc</i>	0,72528	0,02321	0,01683	0	5
<i>Xcv</i> x <i>Xv</i>	0,55707	0,01469	0,00818	1	5
<i>Xcv</i> x <i>Xe</i>	0,42381	0,01957	0,00829	1	0
<i>Xcv</i> x <i>Xaj</i>	0,91919	0,01404	0,01290	0	9
<i>Xac</i> x <i>Xcc</i>	0,38767	0,03296	0,01278	11	0
<i>Xac</i> x <i>Xv</i>	0,34764	0,03114	0,01083	13	0
<i>Xac</i> x <i>Xe</i>	0,21984	0,03215	0,00707	30	0
<i>Xac</i> x <i>Xaj</i>	0,51282	0,03067	0,01573	0	0
<i>Xcc</i> x <i>Xv</i>	0,24793	0,01586	0,00393	18	0
<i>Xcc</i> x <i>Xe</i>	0,13861	0,01938	0,00269	18	0
<i>Xcc</i> x <i>Xaj</i>	0,63303	0,01786	0,01130	0	0
<i>Xv</i> x <i>Xe</i>	0,02650	0,01728	0,00046	21	0
<i>Xv</i> x <i>Xaj</i>	0,36250	0,01048	0,00380	0	0
<i>Xe</i> x <i>Xaj</i>	0,20836	0,01446	0,00301	0	0

699 <sup>1</sup>*Xcv*: *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*; *Xac*: *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*; *Xcc*: *X. citri* subsp. *citri*; *Xv*: *X.*  
 700 *vesicatoria*; *Xe*: *X. euvesicatoria*; *Xa*: *X. arboricola* pv. *juglandis*

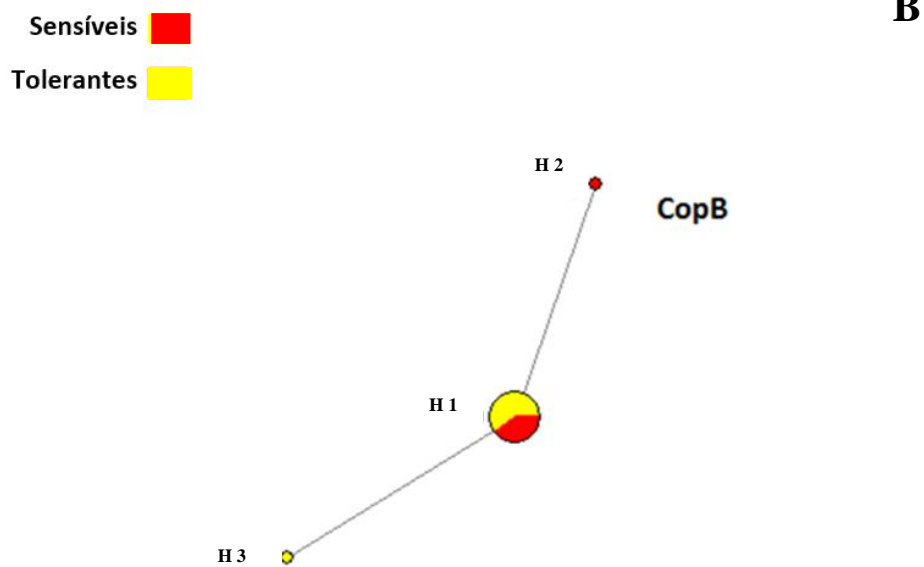
701 <sup>2</sup> $F_{st}$ : índice de fixação haplotípica; Dxy: Número médios de substituições nucleotídicas por sítios entre os dois  
 702 grupos; Da: número líquido de substituições por sítios entre as populações; Ss: número de polimorfismos  
 703 compartilhados entre pares de população; Sf: número de diferenças fixas entre pares de populações.

704



705

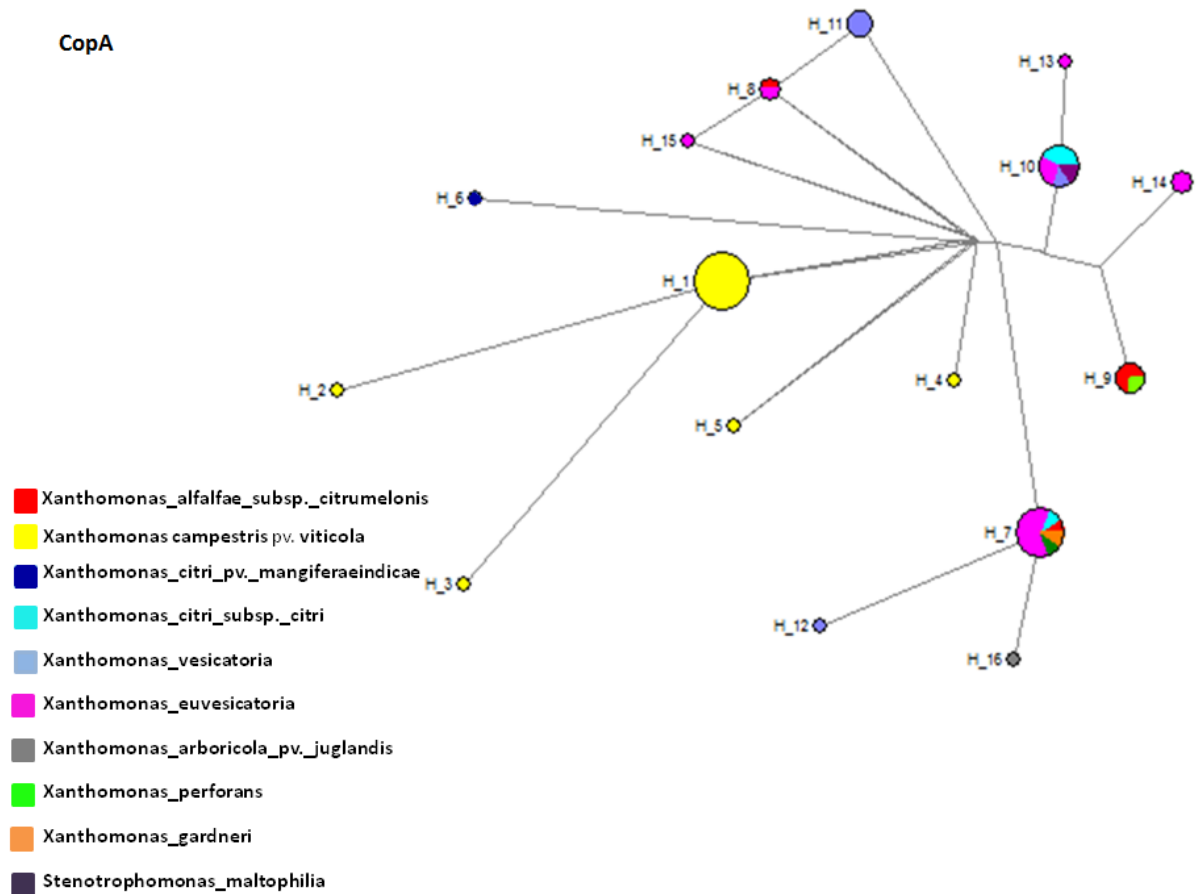
706



707

708 Figura 1 - Rede de haplótipos de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* sensíveis e  
 709 tolerantes ao cobre, avaliados pelos genes *copA* (1A) e *copB* (1B), mostrando quatro e dois  
 710 haplótipos interligados, respectivamente. O tamanho dos círculos é proporcional ao número  
 711 de indivíduos observados em cada haplótipo.

712



713

714 Figura 2 - Rede de haplótipos comparando isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*  
 715 sensíveis e tolerantes ao cobre a espécies do gênero *Xanthomonas*, avaliada pelo gene *copA*,  
 716 mostrando 15 haplótipos interligados. A espécie *Stenotrophomonas maltophilia* foi utilizada  
 717 como grupo externo. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos  
 718 observados em cada haplótipo.

719

720

721

722

723

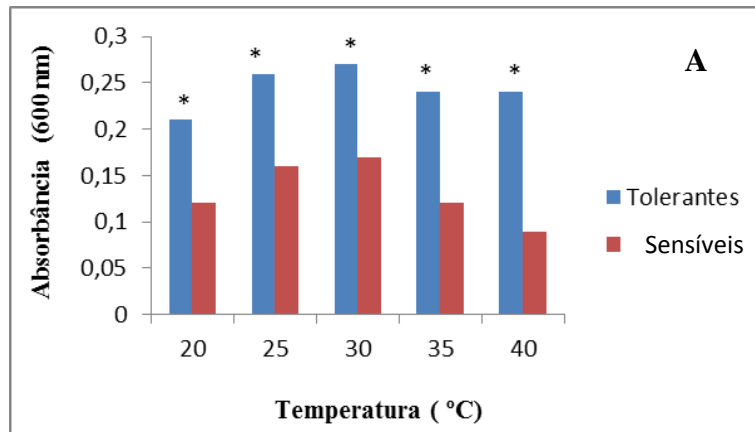
724

725

726

727

728



729

730

731

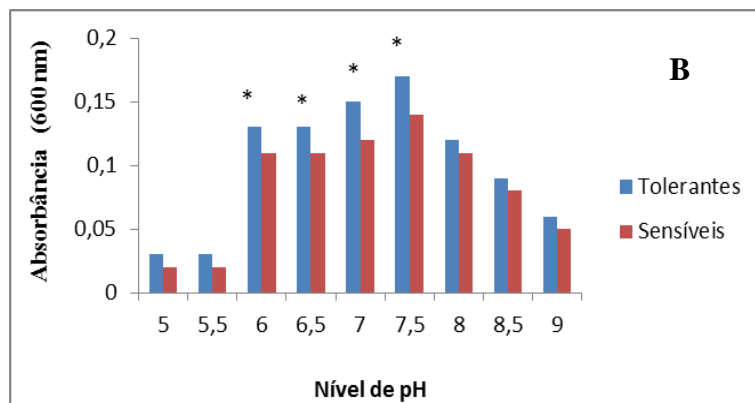
732

733

734

735

736



737

738

739

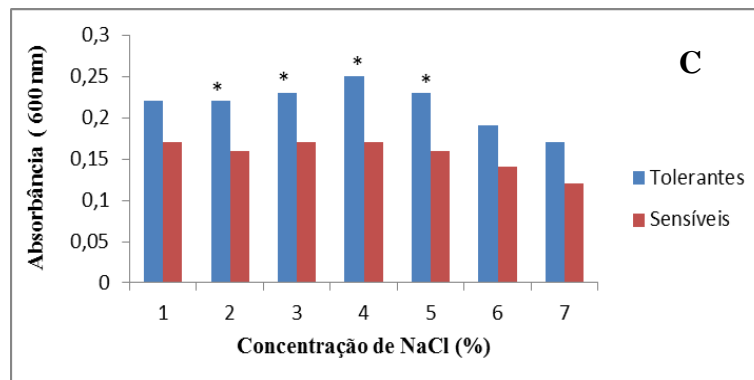
740

741

742

743

744



745

746 Figura 3- Crescimento de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* sensíveis e

747 tolerantes ao cobre em diferentes temperaturas (3A), níveis de pH (3B) e concentrações de

748 NaCl (3C). Valores dentro de cada barra seguidos por asteriscos diferem significativamente

749 pelo teste t-Student ( $P \leq 0,05$ ).

### CAPÍTULO III

---

**Estrutura genética de populações de *Xanthomonas campestris* pv.  
*viticola* no Submédio do Vale do São Francisco, Brasil**

1 **Estrutura genética de populações de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* no Submédio**  
2 **do Vale do São Francisco, Brasil**

3

4 Elias Inácio da Silva<sup>1</sup>, Nelson Bernardi Lima<sup>1</sup>, Moisés Thiago de Souza Freitas<sup>2</sup>, Marco  
5 Aurélio Siqueira da Gama<sup>1</sup>, Rosa de Lima Ramos Mariano<sup>1</sup>, Elineide Barbosa de Souza<sup>3</sup>

6

7 <sup>1</sup>Federal Rural University of Pernambuco – Dept. of Agronomy, Av. Dom Manoel de  
8 Medeiros, s/n, Dois Irmãos – 52171-900 – Recife, PE – Brazil.

9 <sup>2</sup>Universidade Federal de Pernambuco – Dept. of Genetics, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 -  
10 Cidade Universitária Recife - PE - CEP: 50670-901 – Brazil.

11 <sup>3</sup>Federal Rural University of Pernambuco – Dept. of Biology, Av. Dom Manoel de Medeiros,  
12 s/n, Dois Irmãos – 52171-900 – Recife, PE – Brazil.

13 \*Corresponding author <elineidebs@yahoo.com.br>

14

15 RESUMO: O conhecimento sobre a estrutura genética da população de *Xanthomonas*  
16 *campestris* pv. *viticola* é importante para direcionar as estratégias de controle do cancro  
17 bacteriano da videira, principalmente o desenvolvimento e uso de cultivares resistentes ao  
18 patógeno. Objetivou-se estudar a estrutura genética de três populações da bactéria oriundas de  
19 pomares de uva no Submédio do Vale do São Francisco, Nordeste do Brasil, através de perfis  
20 genômicos de rep-PCR. Analisaram-se 105 isolados de *X. campestris* pv. *viticola*,  
21 provenientes de Petrolina- PE (n = 60), Juazeiro-BA (n = 16) e Casa Nova-BA (n = 29),  
22 determinando-se a diversidade intra e interpopulacional. Alta diversidade haplotípica foi  
23 observada em cada população com as técnicas ERIC e REP e baixa diversidade com a técnica  
24 BOX, embora, com valores próximos. Na rede de haplótipos constatou-se a ausência de  
25 estrutura na população com pouco ou nenhum haplótipo compartilhado por isolados das três  
26 populações. Na análise da diferenciação haplotípica entre as populações, os valores dos  
27 índices analisados foram baixos, o que indica pouca diferenciação genética entre elas,  
28 principalmente em relação ao marcador BOX-PCR. Além disso, as populações de *X.*  
29 *campestris* pv. *viticola* de Petrolina-PE, Juazeiro-BA e Casa Nova-BA apresentam baixa  
30 diversidade global.

31 Palavras-chave: *Vitis vinifera*, cancro bacteriano, rep-PCR, Brasil

32

33 ABSTRACT: The knowledge of the genetic structure of the *Xanthomonas campestris* pv.  
34 *viticola* population is important to support the control strategies of the grapevine bacterial  
35 canker, mainly the development and use of resistant cultivars. This work aimed to study the  
36 genetic structure of three populations of this bacterium from grapevines plantations at the  
37 “Submédio of the São Francisco Valley, Northeast of Brazil, using genomic profiles of rep-  
38 PCR. To determine the intra- and inter-population diversity, 105 isolates of *X. campestris* pv.  
39 *viticola* were analyzed, from Petrolina-PE (n = 60), Juazeiro-BA (n = 16) and Casa Nova-BA  
40 (n = 29). ERIC and REP techniques showed high haplotype diversity in each population while  
41 BOX showed low, even though the values were close. The haplotype net detected an absence  
42 of structure in the population with few or none haplotype shared by isolates of the three  
43 populations. The haplotype differentiation analyzes among populations showed low index  
44 values demonstrating low genetic differentiation among them mainly for BOX technique.  
45 Moreover, populations presented low global diversity.

46

47 Keywords: *Vitis vinifera*, bacterial canker, rep-PCR, Brazil.

48

## 49 **Introdução**

50

51 O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo (FAOSTAT, 2015), estando a  
52 uva (*Vitis vinifera*) entre as principais frutas produzidas no país (IBGE, 2015). No Submédio  
53 do Vale do São Francisco, região Nordeste, o Polo Petrolina (estado de Pernambuco) –  
54 Juazeiro (estado da Bahia) se destaca como o maior produtor nacional e é responsável por  
55 99% das exportações de uva de mesa. No entanto, a cultura da uva tem sua produtividade  
56 nessa região diminuída pela ocorrência do cancro bacteriano, causado por *Xantomonas*  
57 *campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, que representa alto risco a vitivinicultura brasileira (Naue et  
58 al., 2014). Além do Brasil, a doença ocorre apenas na Índia (Jambenal et al., 2011) e Tailândia  
59 (Buensanteai, 2004). O cancro bacteriano foi detectado no Brasil em 1998 em parreirais da  
60 região do Submédio do Vale do São Francisco (Lima; Ferreira and Dianese, 1999), onde  
61 acredita-se que foi introduzido inadvertidamente por produtores através de estacas da  
62 variedade Red Globe trazidas da Índia (Trindade; Lima and Ferreira, 2005).

63 A alternativa mais viável para o controle do cancro bacteriano da videira seria o  
64 desenvolvimento e uso de cultivares tolerantes e/ou resistentes, uma vez que não existe um  
65 único método eficiente para o controle da doença (Naue et al., 2014). No entanto, o êxito dos  
66 programas de melhoramento visando o desenvolvimento dessas cultivares pressupõe



67 considerar a variabilidade do hospedeiro e do patógeno. Portanto, a avaliação da estrutura  
68 genética da população do patógeno é essencial para a gestão de um programa de manejo  
69 sustentável que visa resistência de plantas a doenças (McDonald and Linde, 2002).

70 Entende-se por estrutura genética de população a quantidade e distribuição da variação  
71 genética dentro e entre populações, variação esta determinada pelo potencial de alteração dos  
72 organismos de uma população e pela história evolutiva (McDonald and Linde, 2002). A  
73 evolução está relacionada a mudanças no alelo ou frequências genotípicas em populações em  
74 escalas de tempo relativamente curtas (Milgroom, 2015). O estudo da variação genética em  
75 populações de uma espécie envolve basicamente duas questões: (i) quantificar os níveis de  
76 variabilidade dentro das populações e (ii) caracterizar o nível de estruturação genética entre  
77 populações (Hamrick, 1982).

78 A variabilidade de isolados de *X. campestris* pv. *viticola* foi investigada por Trindade  
79 et al. (2005) e Gama (2014). Análises de rep-PCR indicaram a existência de variabilidade  
80 genômica entre 40 isolados de *X. campestris* pv. *viticola* coletados nos estados de  
81 Pernambuco, Bahia e Piauí de 1998 a 2001 (Trindade et al., 2005). Testes fenotípicos,  
82 componentes epidemiológicos e rep-PCR com 115 isolados dessa bactéria, constataram que  
83 eles compõem um grupo homogêneo contendo duas linhas evolucionárias (Gama, 2014). No  
84 entanto, inexistem estudos sobre como essa população está estruturada nos principais  
85 municípios produtores de uva no Submédio do Vale do São Francisco.

86 A análise por meio de PCR tem desempenhado importante papel nos estudos de  
87 diversidade genética. Sequências repetitivas intergênicas, de consenso, dispersas no genoma  
88 bacteriano, conhecidas como ERIC, REP e BOX, geram padrões altamente característicos  
89 quando separados em gel de agarose (De Bruijn, 1992; Versalovic et al., 1994). Estes  
90 marcadores são usados para avaliar níveis de diversidade genética intra e interespecíficas.  
91 Também possibilitam inferir sobre a quantidade de variação genética entre indivíduos da  
92 mesma população, no tempo e no espaço; as relações genéticas entre os indivíduos dentro e  
93 entre linhagens; a localização da fonte de inóculo, se a curtas ou longas distâncias; a dinâmica  
94 das populações de diferentes genótipos; e a origem do fitopatógeno (Milgroom, 1997;  
95 Scortichini, 2005).

96 Devido à importância do cultivo de uva na região do Submédio do vale do São  
97 Francisco e do impacto econômico do cancro bacteriano, estudos sobre a estrutura genética do  
98 patógeno devem ser realizados para caracterizar os isolados de *X. campestris* pv. *viticola*  
99 pertencentes a essa região, gerando informações que irão contribuir significativamente para a  
100 adoção de estratégias adequadas de controle da doença. Sendo assim, o objetivo desse estudo

101 foi analisar a estrutura genética de três de populações de *X. campestris* pv. *viticola* de pomares  
102 de uva no Submédio do Vale do São Francisco através de perfis genômicos de rep-PCR.

103

## 104 **Material e Métodos**

105

### 106 **Isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola***

107 Os isolados de *X. campestris* pv. *viticola* utilizados na pesquisa formam uma coleção  
108 de 105 isolados brasileiros, obtidos entre os anos de 1998 (ano de introdução da doença) a  
109 2012 no Submédio do Vale do São Francisco, nos municípios de Petrolina no estado de  
110 Pernambuco (n= 60), Juazeiro (n= 16) e Casa Nova (n= 29), no estado da Bahia (Tabela 1,  
111 Figura 1). Esses isolados encontram-se depositados na Coleção de Culturas Rosa Mariano do  
112 Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Todos os  
113 isolados foram identificados por Gama (2014) através de PCR com os *primers* semi-  
114 específicos Xcv1F (5' TGCAGGTGAGCTGTGC 3')/Xcv3R (5'  
115 AGTTCGACCACCTTGCCATA 3'), os quais amplificam um fragmento de 243 pb do gene  
116 *hrpB*.

117

### 118 **Extração de DNA**

119 A extração do DNA dos isolados foi realizada utilizando-se o Kit MiniPrep para  
120 extração de DNA genômico bacteriano (Axygen Biosciences, EUA) seguindo as  
121 recomendações do fabricante. A quantificação do DNA genômico foi realizada por meio de  
122 análise comparativa com o marcador High DNA Mass Ladder (Invitrogen, Brasil), utilizando-  
123 se uma mistura contendo 4 µL do DNA concentrado adicionado a 2 µL de tampão de  
124 carregamento 6X DNA Loading Dye (Fermentas Life 183 Sciences, Canadá) e 1,5 µL de  
125 SYBER® Safe DNA Gel Stain (10X) (Life Technologies, São Paulo, Brasil). A análise foi  
126 realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% preparado em tampão TBE 0,5X  
127 (5,4 g de Tris-base; 2,75 g de ácido bórico e 0,375 186 g de EDTA, para 1000 ml) por 1,5 h a  
128 80 V. Posteriormente, o gel foi fotodocumentado e, após a quantificação, as amostras foram  
129 diluídas para uma concentração final de 10 ngµL<sup>-1</sup> de DNA, sendo armazenadas a -20°C.

130

### 131 **Análise de rep-PCR**

132 As reações de REP, ERIC e BOX-PCR foram realizadas segundo Louws et al. (1994),  
133 com modificações: 1X de PCR Master Mix 2X, 2 µM de cada *primer* e 200 ng de DNA. As  
134 amostras foram amplificadas em termociclador Perkin Elmer. Controles negativos (reações

135 livres de DNA) foram incluídos em todos os experimentos para verificar a presença de  
136 contaminantes. A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada em gel de agarose a  
137 1,5%. A corrida eletroforética foi realizada durante 3 h a 80 V em tampão TBE 0,5 X,  
138 utilizando-se os marcadores GenRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas Life Sciences,  
139 Canadá) e GenRuler 1kb bp DNA Ladder (Fermentas Life Sciences, Canadá). Posteriormente,  
140 o gel foi fotodocumentado. Os experimentos foram realizados em duplicata para a conferência  
141 das bandas. As análises dos perfis de amplificação gerados com os *primers* REP, ERIC e  
142 BOX-PCR foram realizadas visualmente de acordo com a presença (1) ou ausência de bandas  
143 (0) de 100 a 3000 pb, sendo registradas apenas bandas reprodutíveis. Os dados gerados com  
144 cada *primer* foram analisados separadamente e em conjunto.

145

#### 146 **Análise da diversidade genética**

147 As primeiras análises foram realizadas ao nível intrapopulacional, onde o nível de  
148 polimorfismo das três populações foi avaliado separadamente através dos seguintes  
149 parâmetros: diversidade haplotípica (Hd) e número de haplótipos (h). A rede de haplótipos foi  
150 gerada através do software NETWORK v. 4.6 ([www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com)) utilizando o  
151 método Median-joining (Bandelt et al., 1999) para verificar o nível de compartilhamento e a  
152 frequência de distribuição dos haplótipos entre as três populações.

153 As análises posteriores foram realizadas ao nível interpopulacional. Foi estimada a  
154 diferenciação genética entre as três populações através da determinação do índice Hs, que  
155 mede a diversidade haplotípica e das estimativas do índice  $G_{st}$  (Nei, 1973), que é um índice de  
156 fixação do polimorfismo estimado a partir da diversidade haplotípica. Todos os parâmetros  
157 foram calculados através do programa DnaSP v. 4.0 (Rozas et al., 2003).

158

#### 159 **Resultados**

160

161 Por meio da técnica de rep-PCR a amplificação do DNA genômico dos 105 isolados  
162 gerou um total de 45 bandas reprodutíveis variando de 100 a 3000 pb, sendo observadas 14,  
163 17 e 14 bandas com os *primers* REP, ERIC e BOX, respectivamente.

164 As populações de *X. campestris* pv. *viticola* foram analisadas quanto a diversidade  
165 genética intrapopulacional com base nos dados de REP, ERIC e BOX-PCR isoladamente e  
166 em conjunto (Tabela 2). Alta diversidade haplotípica foi observada quando se tratou das  
167 técnicas ERIC e REP e baixa diversidade na técnica BOX, no entanto, com valores próximos  
168 nas três populações. Quanto ao número de haplótipos formados constatou-se que foi maior

169 nos isolados pertencentes à população de Petrolina-PE em relação aos das populações de  
170 Juazeiro-BA e Casa Nova-BA, quando analisados os *primers* REP (22, 8 e 13 haplótipos) e  
171 ERIC-PCR (38, 12 e 21 haplótipos). No entanto, o número de haplótipos foi similar nas  
172 populações com os primers BOX-PCR (5, 5 e 4 haplótipos).

173 A análise realizada com os dados de REP, ERIC e BOX combinados linearmente (rep-  
174 PCR) permitiu verificar a mesma tendência observada com a análise dos dados isoladamente  
175 para REP e ERIC, com alta diversidade haplotípica e número de haplótipos de 59, 15 e 29,  
176 respectivamente para Petrolina-PE, Juazeiro-BA e Casa Nova-BA (Tabela 2).

177 Nas redes de haplótipos constatou-se a existência de 27, 53 e 7 haplótipos,  
178 respectivamente para os *primers* REP, ERIC e BOX, distribuídos entre as espécies de *X.*  
179 *campestris* pv. *viticola*, mas apenas 5 (H3, H5, H9, H14, H16 e H22), 4 (H9, H13, H17 e  
180 H28) e 3 (H1, H2 e H3) haplótipos foram compartilhados por isolados das três populações  
181 (Figura 2A, B, C). Não foi possível verificar a formação de agrupamentos distintos. Na  
182 análise conjunta dos dados (rep-PCR) foram observados 38 haplótipos, porém nenhum  
183 compartilhado por isolados representativos das três populações (Figura 2D). Os resultados  
184 evidenciam a ausência de estruturação na população de *X. campestris* pv. *viticola* do  
185 Submédio do Vale do São Francisco.

186 A diferenciação haplotípica foi calculada entre as três populações de *X. campestris* pv.  
187 *viticola*, usando o parâmetro  $G_{st}$ . Os  $G_{sts}$  encontrados nas interações entre Petrolina-PE, Casa  
188 Nova-BA e Juazeiro-BA foram baixos, indicando pouca diferenciação genética entre as  
189 populações de *X. campestris* pv. *viticola* do Submédio do Vale do São Francisco,  
190 principalmente em relação ao marcador BOX-PCR, que apresentou valores negativos de -  
191 0,00406; -0,00687 e -0,01517, respectivamente (Tabela 3). A média ponderada das  
192 diversidades haplotípicas entre populações ( $H_s$ ), indicou que existe uma variabilidade  
193 haplotípica similar entre as combinações de duas populações, em todos os marcadores  
194 analisados, sendo essa menor variabilidade indicada no BOX-PCR (Tabela 3).

195

## 196 **Discussão**

197

198 Foi avaliada a estrutura de populações de *X. campestris* pv. *viticola* presentes no  
199 Submédio do Vale do São Francisco, a partir de uma população de 105 isolados oriundos de  
200 um município de Pernambuco (Petrolina) e dois da Bahia (Juazeiro e Casa Nova). Essa região  
201 tem se tornado cada vez mais conhecida pela produção de uvas de alta qualidade, mas tem um

202 grande problema fitossanitário, o cancro bacteriano, que é um fator limitante à produção  
203 (Naue et al., 2014).

204 O conhecimento e a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de  
205 populações de *X. campestris* pv. *viticola* é essencial para adoção de estratégias de controle da  
206 doença e manutenção de uma resistência durável. Diversos marcadores moleculares têm sido  
207 muito utilizados para estudos de populações em fitopatógenos, dentre eles rep-PCR (Ma et al.,  
208 2001; Chen et al., 2002; Kubisiak et al., 2004; Valverde et al., 2007).

209 Com os marcadores rep-PCR foram analisadas a diversidade genética intra e  
210 interpoblacional de *X. campestris* pv. *viticola*. Os níveis de diferenciação genética  
211 intrapoblacional têm sido usados para fazer inferências acerca da sua biologia e índices  
212 como  $G_{ST}$ , têm sido usados em fitopatógenos para inferir variabilidade entre populações  
213 (Leung and Williams, 1986; Boeger et al., 1993; Goodwin et al., 1993).

214 Os níveis de  $G_{st}$  encontrados entre as populações de *X. campestris* pv. *viticola* de  
215 Petrolina-PE, Juazeiro-BA e Casa Nova-BA foram baixos, o que indica pouca divergência  
216 genética entre as populações. No entanto, alta diversidade haplotípica (Hd) foi encontrada  
217 dentro de cada população nas análises de REP, ERIC e rep-PCR, o que originou uma rede de  
218 haplótipos com poucos ou nenhum haplótipo compartilhado por isolado das três populações.  
219 Esses resultados indicam que a população de *X. campestris* pv. *viticola* do Submédio do Vale  
220 do São Francisco não está estruturada.

221 Por outro lado, nas análises de BOX-PCR foram verificados índices de  $G_{st}$  negativos e  
222 baixa diversidade haplotípica e, dessa forma, quando se observou a rede de haplótipos a partir  
223 desse marcador, foi possível detectar um maior nível de homogeneidade nas populações  
224 estudadas. Resultado similar foi encontrado por Gama (2014), que a partir de análise de  
225 agrupamento realizada com base nos perfis de BOX-PCR demonstrou a existência de alta  
226 similaridade entre os isolados de *X. campestris* pv. *viticola* oriundos do Submédio do Vale do  
227 São Francisco. Contudo, a homogeneidade encontrada no presente estudo não foi o suficiente  
228 para obtenção de uma população totalmente estruturada, uma vez que foram verificados sete  
229 haplótipos com apenas três compartilhados por isolados das três populações. Apesar disso,  
230 esses resultados sugerem a introdução recente dessas populações nas regiões de Petrolina-PE,  
231 Juazeiro-BA e Casa Nova-BA, o que se confirma com o fato de que o cancro bacteriano da  
232 videira foi detectado pela primeira vez no início de 1998, em parreirais de Petrolina e, no  
233 mesmo ano, foi assinalado também na Bahia, ambos no Submédio do Vale do São Francisco  
234 (Lima et al., 1999). Adicionalmente, a ausência de formação de agrupamentos distintos é um

235 indício de que as populações de *X. campestris* pv. *viticola* estudadas tenham sua  
236 ancestralidade ligadas a um único evento de introdução da bactéria.

237 Nas análises de REP e ERIC-PCR detectou-se um maior polimorfismo entre as  
238 populações em estudo e maior diversidade haplotípica, propondo assim, um processo de  
239 expansão da doença nas áreas de cultivo de videira do Submédio do Vale do São Francisco.  
240 Isso pode ser explicado pela expansão da viticultura no semiárido brasileiro, com o avanço da  
241 área plantada, as várias fases fenológicas da planta de forma simultânea nos pomares e a  
242 importação de novos materiais genéticos, o que têm favorecido a ocorrência da doença. Com  
243 isso, é possível que após a estabilização da variabilidade genômica inicial introduzida na  
244 região, um novo processo de divergência esteja ocorrendo, causado possivelmente, pela  
245 substituição de parreirais formados com cultivares suscetíveis ao cancro bacteriano, por  
246 cultivares com maiores níveis de resistência (Marques, 2007; Gama, 2014).

247 A avaliação dos marcadores de forma combinada (BOX, ERIC e REP-PCR), indicou  
248 uma diversidade haplotípica mais evidente, quando comparado aos valores obtidos na análise  
249 individual dos marcadores. Esse resultado pode estar relacionado as novas combinações dos  
250 haplótipos após as combinações dos três marcadores. Entretanto, os índices de diversidade  
251 haplotípica analisadas para todas as populações mostraram-se bastante homogêneos,  
252 indicando uma semelhança evolutiva em ambas as populações de Petrolina-Pe, Juazeiro-BA e  
253 Casa Nova-BA. Corroborando com esses resultados, a análise de populações de *X. campestris*  
254 pv. *viticola*, oriundas do Submédio do Vale do São Francisco, com base em perfis de rep-  
255 PCR, assinalou a formação de um único grupo abrigando todos os isolados ao nível de 88%  
256 de similaridade e valores de 100% de *bootstrap*, demonstrando alto grau de homogeneidade  
257 Gama (2014).

258 Em conclusão, as populações de *X. campestris* pv. *viticola* de Petrolina-PE, Juazeiro-  
259 BA e Casa Nova-BA apresentam baixa diversidade global e nenhuma estruturação aparente,  
260 indicando deste modo, que essas populações não são estruturadas. Porém, existem indícios do  
261 início de um processo de divergência genética entre as populações estudadas, o que, no futuro,  
262 exigirá o desenvolvimento de métodos de controle da doença mais eficientes. Todavia, para a  
263 obtenção de resultados mais conclusivos se faz necessário estudos mais aprofundados e com  
264 um maior número de marcadores moleculares, buscando melhorar o entendimento das  
265 relações evolutivas entre as populações de *X. campestris* pv. *viticola* e suas implicações no  
266 desenvolvimentos e obtenção de cultivares resistentes e de métodos de controle mais  
267 eficientes para o cancro bacteriano da videira.

268

269 **Agradecimentos**

270

271 Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e  
272 Tecnológico (CNPq) pelo auxílio à Pesquisa (APQ 477521/2011-8) e bolsa de produtividade  
273 a E. B. Souza (Proc. 307348/2011-3).

274

275 **Referências**

276

277 Bandelt, H-J.; Forster, P.; Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific  
278 phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.

279 Boeger, J.M.; Chen, R.S.; McDonald, B.A. 1993. Gene flow between geographic populations  
280 of *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) detected with  
281 restriction fragment length polymorphism markers. *Phytopathology* 83: 1148-1154.

282 Buensanteai, M.N. Identification, development of detection method and survey of bacterial  
283 necrosis disease of grapevine in Thailand. 2004. Dissertação de Mestrado, Suranaree  
284 University of Technology, Muang District.

285 Chen, W.; Shi, X.; Chen, Yung-Chun. 2002. Microsatellite markers and clonal genetic  
286 structure of the fungal pathogen *Phialophora gregata*. *Mycological Research* 106: 194-  
287 202.

288 De Bruijn, F. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial  
289 repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to  
290 fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Applied and  
291 environmental microbiology* 58: 2180-2187.

292 Faostat – Food and Agriculture Organization. 2015. Faostat [on line]. Rome. Food and  
293 Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em:  
294 <http://faostat3.fao.org/home/index.html> [Acessado Fev 06, 2017]

295 Gama, M.A.S. 2014. Caracterização polifásica de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e  
296 reposicionamento de espécies de *Xanthomonas* patogênicas à videira e cajueiro. Tese de  
297 Doutorado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife.

298 Goodwin, S.B.; Saghai-Marroof, M.A.; Allard, R.W.; Webster, R.K. 1993. Isozyme  
299 variation within and among populations of *Rhynchosporium secalis* in Europe, Australia  
300 and the United States. *Mycological Research* 97: 49-58.

301 Hamrick, J.L. 1982. Plant population genetics and evolution. *American Journal of Botany* 69:  
302 1685-1693.

- 303 Ibge - Instituto Brasileiro de Geografia E Estatística. Produção Agrícola Municipal [on line].  
304 Coordenação de Agropecuária. Brasília: Instituto Brasileiro de geografia e Estatística,  
305 2015. Disponível em: [www.sidra.ibge.gov.br](http://www.sidra.ibge.gov.br) [Acessado Fev 02, 2017]
- 306 Jambenal, S.; Ravikumar M.R.; Hiremani, N. 2011. Evaluation of different chemicals and  
307 bioagents against bacterial leaf spot of grapevine and their effect on yield and yield  
308 parameters. *International Journal of Plant Protection* 4: 377-380.
- 309 Kubisiak, T.L.; Roberds, J.H.; Spaine, P.C.; Doudrick, R.L. 2004. Microsatellite DNA  
310 suggests regional structure in the fusiform rust fungus *Cronartium quercuum* f. sp  
311 *fusiforme*. *Heredity* 91: 41-50.
- 312 Leung, H.; Williams, P.H. 1986. Enzyme polymorphism and genetic differentiation among  
313 geographic isolates of the rice blast fungus. *Phytopathology* 76: 778-783.
- 314 Lima, M.F.; Ferreira, M.A.S.V.; Moreira, W.A.; Dianese, J.C. 1999. Bacterial canker of  
315 grapevine in Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 24: 440-443.
- 316 Ma, Z.; Boehm, E.W.A.; Luo, W.; Michailides, T.J. 2001. Population structure of  
317 *Botryosphaeria dothidea* from Pistachio and other hosts in California. *Phytopathology* 91:  
318 665-672.
- 319 Marques, E. 2007. Variabilidade e tolerância ao cobre em *Xanthomonas campestris* pv.  
320 *viticola* agente causal do cancro bacteriano da videira *Vitis* spp. 65 f. Dissertação  
321 (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília.
- 322 McDonald, B.A.; Linde, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and  
323 durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40: 349-379.
- 324 Milgroom, M.G. 1997. Genetic variation and the application of genetic markers for studying  
325 plant pathogen populations. *Journal of Plant Pathology* 79: 1-13.
- 326 Milgroom, M.G. 2015. Population biology of plant pathogens: genetics, ecology and  
327 evolution. American Phytopathological Society Press, Saint Paul, Minnesota, USA.
- 328 Naue, C.R.; Barbosa, M.A.G.; Batista, D.C.; Souza, E.B.; Mariano, R.L.R. 2014. Efeito do  
329 tratamento de bacelos de videira Red Globe no controle do cancro bacteriano causado por  
330 *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Revista Brasileira de Fruticultura* 36: 853-861.
- 331 Naue, C.R.; Costa, V.S.O.; Barbosa, M.A.G.; Batista, D.C.; Souza, E.B.; Mariano, R.L.R.  
332 2014. *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* on grapevine cutting tools and water: survival  
333 and disinfection. *Journal of Plant Pathology* 96: 451-458.
- 334 Nei, M. 1973. Analysis of genes diversity in subdivided populations. *Proceedings of the*  
335 *National Academy of Sciences of the United States of America* 70: 3321-3323.



- 336 Rozas, J.; Sánchez-DelBarrio, J.C.; Messeguer, X.; Rozas, R. (2003). DnaSP, DNA  
337 polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496–  
338 2497.
- 339 Scortichini, M. 2005. The population structure of some plant pathogenic bacteria: an  
340 ecological and adaptive perspective. *Journal of Plant Pathology* 87: 5-12.
- 341 Trindade, L.C.; Lima, M.F.; Ferreira, M.A.S.V. 2005. Molecular characterization of Brazilian  
342 strains of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* by rep-PCR fingerprinting. *Fitopatologia*  
343 *Brasileira* 30: 46-54.
- 344 Valverde, A.; Humbert, T.; Stolov, A.; Dagar, A.; Kopelowitz, J.; Burdiman, S. 2007.  
345 Assessment of genetic diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates from  
346 Israel by various DNA fingerprinting techniques. *Plant Pathology* 56: 17-25.
- 347 Versalovic, J.; Schneider, M.; De Bruijn, F.; Lupski, J.R. 1994. Genomic fingerprinting of  
348 bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in molecular*  
349 *and cellular biology* 5: 25-40.
- 350
- 351

352 Tabela 1 - Descrição dos isolados brasileiros e patótipo de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*

<b>Código<sup>1</sup></b>	<b>Ano de isolamento</b>	<b>Origem</b>	<b>Órgão</b>	<b>Cultivar</b>	<b>Código<sup>1</sup></b>	<b>Ano de isolamento</b>	<b>Origem</b>	<b>Órgão</b>	<b>Cultivar</b>
UnB 1191	1998	Petrolina/PE	Folha	Itália	Xcv72	2009	Casa Nova/BA	Folha	Thompson
UnB 1183	1998	Petrolina/PE	Folhas	Red Globe	Xcv71	2009	Petrolina/PE	Folha e ramo	Festival
IBSBF1506	1999	Petrolina/PE	ND	ND	Xcv70	2009	Casa Nova/BA	Folha	Benitaka
UnB 1299	2004	Juazeiro/BA	Folhas	Thompson	Xcv68	2009	Casa Nova/BA	Folha	ND
UnB 1315	2005	Petrolina/PE	Nervuras	Red Globe	Xcv65	2009	Casa Nova/BA	Folha e ramo	Itália
UnB 1314	2005	Petrolina/PE	Folhas	Red Globe	Xcv56	2009	Casa Nova/BA	ND	Festival
UnB 1309	2005	Petrolina/PE	Haste	Festival	Xcv55	2009	Casa Nova/BA	Folha	Festival
UnB 1307	2005	Petrolina/PE	Ráquis	Festival	Xcv54	2009	Casa Nova/BA	Folha	Festival
UnB 1304	2005	Petrolina/PE	Pecíolo	Festival	Xcv52	2009	Casa Nova/BA	Folha e ramo	Festival
Xcv9	2008	Petrolina/PE	ND	Red Globe	Xcv50	2009	Petrolina/PE	Engaço	ND
Xcv8	2008	Petrolina/PE	ND	Red Globe	Xcv47	2009	Juazeiro/BA	Folha	Itália
Xcv5	2008	Petrolina/PE	Folha	Red Globe	Xcv46	2009	Juazeiro/BA	Folha	Festival
Xcv90	2009	Juazeiro/BA	Folha	Thompson	Xcv45	2009	Juazeiro/BA	Folha	Crimson
Xcv89	2009	Casa Nova/BA	Folha	Itália Muscat	Xcv44	2009	Juazeiro/BA	Folha	Thompson
Xcv81	2009	Casa Nova/BA	Folha	Thompson	Xcv42	2009	Juazeiro/BA	Folha e ramo	Crimson
Xcv80	2009	Petrolina/PE	Folha e ramo	Festival	Xcv40	2009	Petrolina/PE	Folha	Itália
Xcv79	2009	Petrolina/PE	Folha e ramo	Red Globe	Xcv39	2009	Petrolina/PE	Folha e pecíolo	Festival
Xcv78	2009	Petrolina/PE	ND	ND	Xcv34	2009	Petrolina/PE	ND	Thompson
Xcv77	2009	Petrolina/PE	Folha e ramo	Festival	Xcv33	2009	Petrolina/PE	ND	Festival
Xcv76	2009	Petrolina/PE	Folha e ramo	Festival	Xcv28	2009	Petrolina/PE	ND	Festival

Xcv26	2009	Petrolina/PE	ND	Thompson	Xcv142	2010	Juazeiro/BA	Folha	Festival
Xcv21	2009	Petrolina/PE	ND	Thompson	Xcv137	2010	Casa Nova/BA	Folha	Thompson
Xcv18	2009	Petrolina/PE	Folha	Festival	Xcv133	2010	Petrolina/PE	Ramo	Festival
Xcv17	2009	Petrolina/PE	ND	Festival	Xcv132	2010	Casa Nova/BA	Folha	Thompson
Xcv16	2009	Petrolina/PE	ND	Thompson	Xcv129	2010	Juazeiro/BA	Folha	Festival
Xcv15	2009	Petrolina/PE	Engaço	Festival	Xcv105	2010	Petrolina/PE	ND	ND
Xcv13	2009	Petrolina/PE	Ramo	Festival	Xcv104	2010	Juazeiro/BA	Folha	Red Globe
Xcv124	2009	Petrolina/PE	Folha	Red Globe	ENA4600	2010	Petrolina/PE	ND	ND
Xcv119	2009	Petrolina/PE	Ramo	Thompson	ENA4598	2010	Petrolina/PE	ND	ND
Xcv117	2009	Petrolina/PE	Folha	Red Globe	Xcv216	2011	Casa Nova/BA	ND	ND
Xcv116	2009	Petrolina/PE	Ramo	Thompson	Xcv214	2011	Casa Nova/BA	Nervura	Thompson
Xcv114	2009	Petrolina/PE	Ramo	Thompson	Xcv210	2011	Petrolina/PE	ND	ND
Xcv112	2009	Petrolina/PE	Ramo	Red Globe	Xcv208	2011	Petrolina/PE	Pecíolo	Festival
Xcv108	2009	Petrolina/PE	Folha	Itália Melhorada	Xcv207	2011	Petrolina/PE	Pecíolo	Thompson
Xcv103	2009	Petrolina/PE	Ramo	Festival	Xcv206	2011	Petrolina/PE	Pecíolo	Festival
Xcv91	2010	Juazeiro/BA	Folha	Thompson	Xcv204	2011	Petrolina/PE	Nervura	Sugraone
Xcv158	2010	Petrolina/PE	Folha	Festival	Xcv203	2011	Petrolina/PE	Nervura	Thompson
Xcv156	2010	Petrolina/PE	Folha	Thompson	Xcv202	2011	Petrolina/PE	Nervura	Festival
Xcv154	2010	Casa Nova/BA	Folha	Red Globe	Xcv201	2011	Petrolina/PE	Nervura	Thompson
Xcv153	2010	Casa Nova/BA	Folha	Red Globe	Xcv200	2011	Juazeiro/BA	Nervura	Red Globe
Xcv143	2010	Petrolina/PE	Pecíolo	Red Globe	Xcv198	2011	Petrolina/PE	Nervura	Red Globe
Xcv197	2011	Petrolina/PE	Ramo	Red Globe	Xcv231	2012	Casa Nova/BA	Baga	Red Globe

Xcv192	2011	Juazeiro/BA	Pecíolo	Thompson	Xcv230	2012	Casa Nova/BA	Ramo	Red Globe
Xcv191	2011	Juazeiro/BA	Nervura	Thompson	Xcv229	2012	Casa Nova/BA	Folha	Red Globe
Xcv181	2011	Juazeiro/BA	Nervura	Red Globe	Xcv228	2012	Casa Nova/BA	Folha	Red Globe
Xcv179	2011	Casa Nova/BA	Folha	Benitaka	Xcv227	2012	Casa Nova/BA	Folha	Red Globe
Xcv178	2011	Casa Nova/BA	Ramo	Festival	Xcv226	2012	Casa Nova/BA	Folha	Red Globe
Xcv176	2011	Juazeiro/BA	Folha	Red Globe	Xcv225	2012	Petrolina/PE	Folha	Red Globe
Xcv171	2011	Petrolina/PE	Nervura	Sugra 18	Xcv224	2012	Petrolina/PE	Folha	Red Globe
Xcv235	2012	Casa Nova/BA	ND	ND	Xcv223	2012	Petrolina/PE	Folha	Red Globe
Xcv234	2012	Casa Nova/BA	ND	ND	Xcv222	2012	Petrolina/PE	Folha	Red Globe
Xcv233	2012	Casa Nova/BA	Folha	Red Globe	Xcv221	2012	Casa Nova/BA	ND	ND
Xcv232	2012	Casa Nova/BA	Ramo	Red Globe					

353 <sup>1</sup> IBSBF1967 (isolado patótipo) = ICMP3867, LMG965 e NCPPB2475. IBSBF: Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (São  
354 Paulo, Brasil); ICMP: International Collection of Microorganisms from Plants, (Auckland, New Zealand); LMG: Belgian Coordinated Collections  
355 of Micro-organisms (Ghent, Belgium); NCPPB: National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (York, United Kingdom); UnB: Coleção de  
356 Bactérias Fitopatogênicas do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília (Distrito Federal, Brasil); ENA: Coleção de Bactérias do  
357 Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brasil). Xcv = isolados de *X. campestris* pv. *viticola* da  
358 Coleção de Culturas Rosa Mariano do Laboratório de Fitobacteriologia (LAFIBAC) (Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE,  
359 Pernambuco, Brasil.

360 Tabela 2 - Diversidade genética intrapopulacional mensurada para cada população de  
 361 *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* de videiras do Submédio do Vale do São Francisco,  
 362 Nordeste do Brasil, analisada por rep-PCR.

População <sup>1</sup>	N	REP		ERIC		BOX		Rep-PCR	
		Hd	H	Hd	H	Hd	H	Hd	H
Petrolina	60	0,94124	22	0,97797	38	0,52429	5	0,99444	59
Juazeiro	16	0,85000	8	0,94167	12	0,60000	5	0,99167	15
Casa Nova	29	0,92611	13	0,97044	21	0,50000	4	1,00000	29

363 <sup>1</sup>Petrolina: município do estado de Pernambuco; Juazeiro e Casa Nova: municípios do estado da Bahia; N:  
 364 tamanho da amostra; Hd: diversidade haplotípica; h: haplótipo.

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386 Tabela 3 - Diferenciação genética entre populações de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* de videiras do Submédio do Vale do São Francisco,  
 387 Nordeste do Brasil, analisada por rep-PCR.

População <sup>1</sup>	REP		ERIC		BOX		Rep-PCR	
	Hs	G <sub>st</sub>	Hs	G <sub>st</sub>	Hs	G <sub>st</sub>	Hs	G <sub>st</sub>
Petrolina x Juazeiro	0,92350	0,01183	0,97091	0,01135	0,53901	-0,00406	0,99792	0,00805
Petrolina x Casa Nova	0,93644	0,00273	0,97558	0,00281	0,51658	-0,00687	0,99961	0,00167
Juazeiro x Casa Nova	0,90012	0,01063	0,96062	-0,00273	0,53415	-0,01517	0,99715	0,00195

388 <sup>1</sup>Petrolina: município do estado de Pernambuco; Juazeiro e Casa Nova: municípios do estado da Bahia; Hs: Média ponderada da diversidade haplotípica entre populações;  
 389 G<sub>st</sub>: Índice de fixação do polimorfismo estimado a partir da diversidade haplotípica; Da: número de substituições por local entre populações.

390

391

392

393

394

395

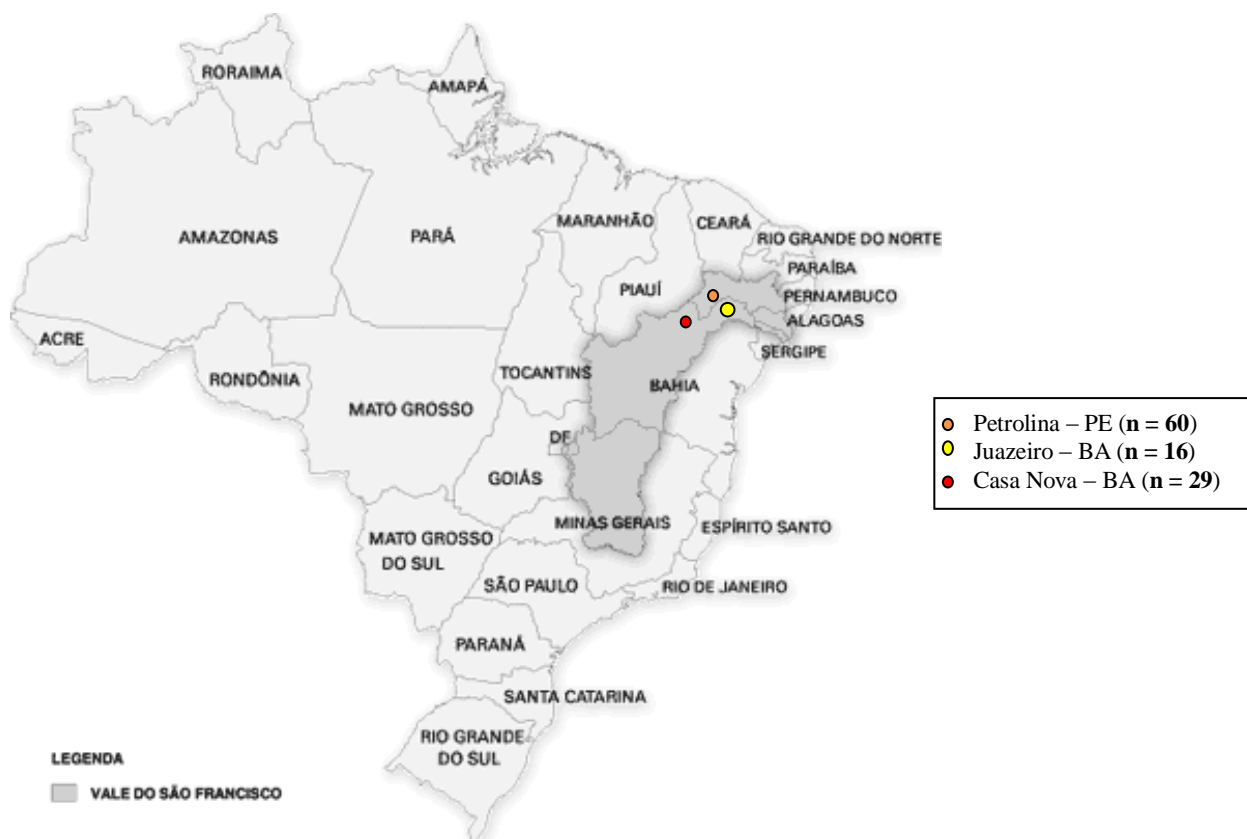
396

397

398

399

400



401

402 Figura 1- Origem dos isolados das populações de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* do  
403 Submédio do Vale do São Francisco, Nordeste do Brasil.

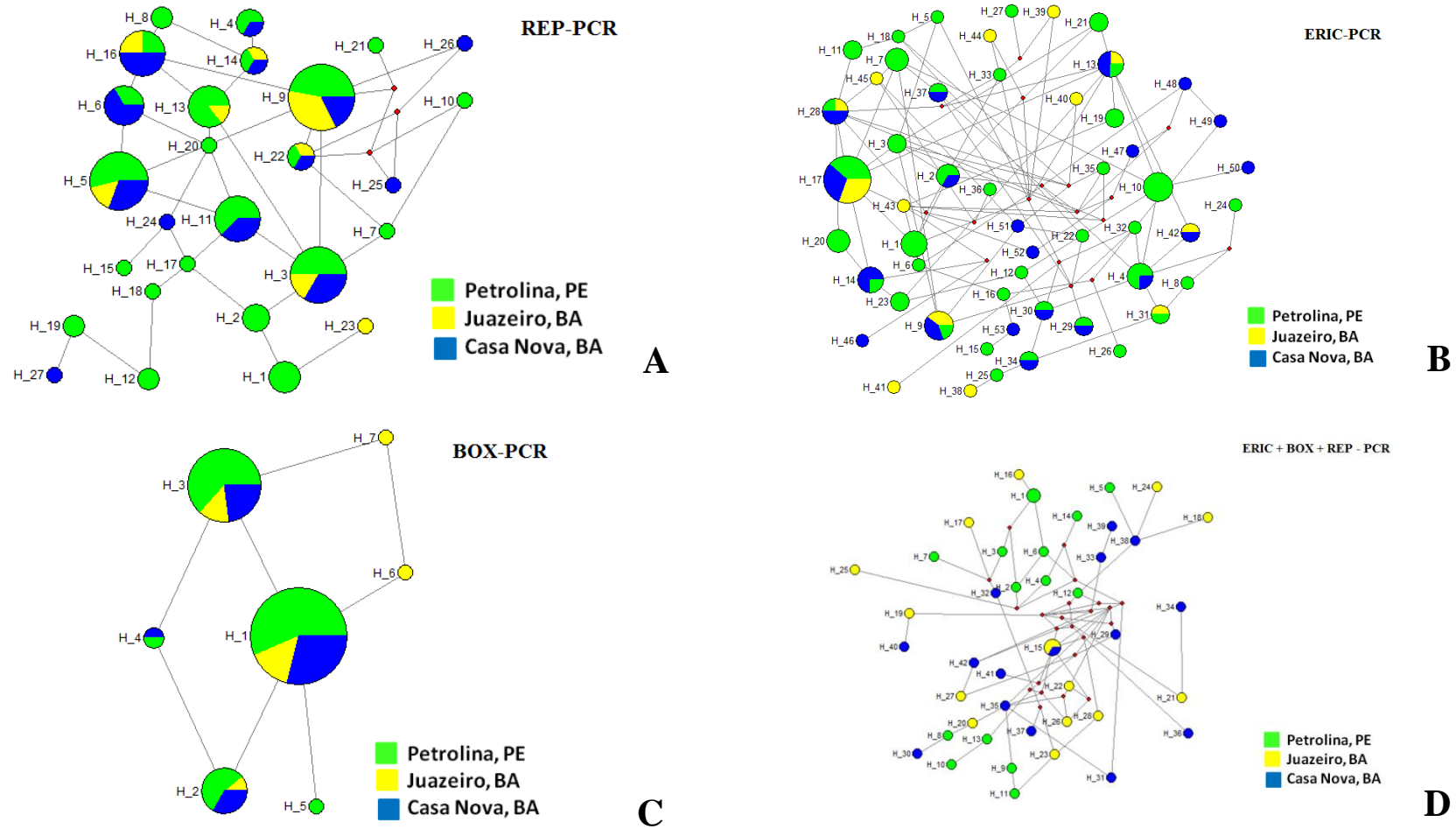
404

405

406

407

408



409 Figura 2- Rede de haplótipos de 105 isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, representativa de três populações da bactérias de videira do Submédio  
 410 do Vale do São Francisco, mostrando haplótipos interligados, através de análise de REP (27 haplótipos, A), ERIC (53 haplótipos, B), BOX (7 haplótipos, C) e  
 411 rep-PCR (38 haplótipos, D). O tamanho dos círculos haplótipos são proporcionais ao número de indivíduos observados em cada haplótipos. Os círculos  
 412 pequenos (Vermelhos) representam eventos mutacionais.



## **CONCLUSÕES GERAIS**

---

## CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ De 70 isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* oriundos do Submédio do Vale do São Francisco 33 % foram classificados como tolerantes ao hidróxido de cobre a 140  $\mu\text{g ml}^{-1}$   $\text{Cu}^{2+}$  e 30 % ao oxiclureto de cobre a 70 ou 140  $\mu\text{g ml}^{-1}$   $\text{Cu}^{2+}$ ;
- ✓ Não existe relação entre ano de coleta dos isolados de *X. campestris* pv. *viticola* com a tolerância ao cobre;
- ✓ A tolerância ao cobre não reduz a adaptabilidade dos isolados de *X. campestris* pv. *viticola*;
- ✓ Os genes *copA* e *copB* estão presentes nos isolados sensíveis e tolerantes ao cobre, não havendo mutação aparente, o que indica que não estão envolvidos na resistência ao cobre;
- ✓ Com base no gene *copA*, *X. campestris* pv. *viticola* tem elevada similaridade genética compartilhada com *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*, *X. citri* subsp. *citri* e *X. arboricola* pv. *juglandis*;
- ✓ De acordo com análise de diversidade intrapopulacional não existe população de *X. campestris* pv. *viticola* estruturada em Petrolina-PE, Juazeiro-BA e Casa Nova, Submédio do Vale do São Francisco;
- ✓ Existe baixa diferenciação genética entre as populações de *X. campestris* pv. *viticola* de Petrolina-PE, Juazeiro-BA e Casa Nova-BA.