

**FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA  
MESTRADO PROFISSIONAL EM  
CONTROLE DE DOENÇAS E PRAGAS DOS CITRUS**

**TAMIRIS GARCIA DA SILVA**

**Descrição de isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* tolerantes  
ao cobre e comparação genotípica com isolados sensíveis e  
resistentes**

Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da  
Citricultura como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em Fitossanidade

Orientador: Dr. Franklin Behlau

**Araraquara  
Agosto 2018**

**TAMIRIS GARCIA DA SILVA**

**Descrição de isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* tolerantes  
ao cobre e comparação genotípica com isolados sensíveis e  
resistentes**

Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da  
Citricultura como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em Fitossanidade

Orientador: Dr. Franklin Behlau

**Araraquara  
Agosto 2018**

## TAMIRIS GARCIA DA SILVA

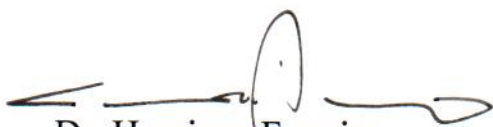
Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da Citricultura - Fundecitrus, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitossanidade.

Araraquara, 31 de agosto de 2018.

### BANCA EXAMINADORA



Dr. Franklin Behlau (Orientador)  
Fundo de Defesa da Citricultura - FUNDECITRUS, Araraquara/SP



Dr. Henrique Ferreira  
Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rio Claro/SP.



Dr. Nelson Arno Wulff  
Fundo de Defesa da Citricultura - FUNDECITRUS, Araraquara/SP

Dedico este trabalho...  
Primeiramente a Deus e  
a todas as pessoas que amo e que fazem parte da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por estar presente em cada momento da minha vida, por me guiar e iluminar sempre. Gratidão Senhor.

Ao Fundecitrus - Fundo de Defesa da Citricultura, em nome de Antônio J. Ayres, agradeço imensamente pela oportunidade em cursar o Mestrado e principalmente pela confiança.

Agradeço imensamente ao Dr. Franklin Behlau, primeiramente pela oportunidade em cursar o Mestrado e pela orientação deste trabalho. Também ao apoio, ensinamentos, paciência, confiança, e principalmente por acreditar no meu trabalho, que Deus lhe abençoe.

A minha mãe, pai e irmã, sem sombra de dúvida vocês são minha inspiração, exemplo de luta, humildade e superação. Só tenho a agradecer a Deus por fazer parte desta família, pois se não fosse por vocês, hoje, eu não estaria aqui.

Agradeço do fundo do meu coração aos meus avós materno e paterno, pelo amor, carinho, conselhos, e claro que não poderia esquecer, pelos inúmeros almoços de domingo, comida de vó é tudo de bom.

Ao meu companheiro de trabalho e grande amigo Fabrício J. Jaciani, agradeço de coração pelos ensinamentos, ajudas na bancada, pelos diversos conselhos, pela paciência e por me escutar nas horas que precisei de um ombro amigo. Thanks my friend!!!

Aos meus companheiros do dia-a-dia de todos estes anos de trabalho no Fundecitrus, em especial a Rosana, Camila, Tati Malara, Eder, Sidnei, Deividson, Lourdes e Priscila A. Agradeço a amizade, ao convívio, as conversas, risadas, brincadeiras e por tornar a jornada de trabalho muito mais agradável.

Agradeço a Elaine C. Martins, pelos ensinamentos, conselhos, e ajudas e dicas, com protocolos, reagentes, cálculos, concentrações. Obrigada por tudo.

Um agradecimento especial ao João Vitor P., Ana Laura G., Fernanda C., Eder P., Leticia C., Rafael S. e Talita A. Com vocês, a palavra 'estagiário' ganhou novos sinônimos:

comprometimento, dedicação, profissionalismo e amizade. Não tenho dúvida que cada um deixou e deixa sua marca.

Agradeço aos professores do MasterCitrus, por contribuírem para meu enriquecimento profissional, e também pela paciência comigo pois sempre ficava até os últimos minutos nos horários de provas..rsrs

Agradeço a Amanda O., uma excelente profissional, exemplo de dedicação, super, mega paciente, muito obrigada pela revisão da dissertação e sugestões.

Aos amigos do 6º ciclo do Mestrado, agradeço pela ótima convivência durante o ano, pelas conversas, risadas e trocas de experiências que muito nos enriqueceram. Tenho certeza que nossas sextas-feiras não serão mais as mesmas.

Um agradecimento mais que especial ao meu companheiro e amigo Denis R. Marin, por sempre estar ao meu lado, pela paciência e compreensão, pelas horas de estudos, por assistir inúmeras vezes minhas apresentações..rsrs não tenho dúvida de que você é e sempre será meu porto seguro...

...Amo você!!!

À todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram na realização deste trabalho, o meu muito obrigada!

“Observe com otimismo as dificuldades que apareçam,  
interpretando-as por lições necessárias”  
*André Luiz – Chico Xavier*

## Descrição de isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* tolerantes ao cobre e comparação genotípica com isolados sensíveis e resistentes

**Autor:** Tamiris Garcia da Silva  
**Orientador:** Dr. Franklin Behlau

### Resumo

A aplicação de bactericidas a base de cobre é a principal medida de controle do cancro cítrico em regiões onde a doença é endêmica. No entanto, esta medida pode levar ao desenvolvimento de isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) resistentes ao cobre (Cu<sup>R</sup>). A caracterização da sensibilidade ao cobre de *X. citri* provenientes de pomares de laranja do Paraná não revelou a existência de isolados Cu<sup>R</sup>, mas tolerantes ao cobre (Cu<sup>T</sup>). O objetivo deste trabalho foi comparar os determinantes genéticos que diferenciam os isolados Cu<sup>T</sup> dos sensíveis (Cu<sup>S</sup>) e Cu<sup>R</sup>. Isolados de *X. citri* Cu<sup>T</sup> suportam concentrações intermediárias de cobre em relação aos isolados Cu<sup>S</sup> e Cu<sup>R</sup>. Isolados Cu<sup>T</sup> cresceram em meio de cultura contendo de 150-200 mg/L de sulfato de cobre pentahidratado, enquanto isolados Cu<sup>S</sup> e Cu<sup>R</sup> cresceram em meio com até 125 mg/L e até 400-500 mg/L, respectivamente. Isolados Cu<sup>T</sup> diferem geneticamente dos isolados Cu<sup>R</sup> por não apresentarem os genes de resistência ao cobre e os plasmídeos grandes ( $\geq 200$  kpb) que normalmente portam estes genes. Isolados Cu<sup>T</sup> diferem geneticamente dos isolados Cu<sup>S</sup> pela maior expressão dos genes cromossomais homólogos aos genes de resistência, *cohA* e *cohB* na presença de cobre. Isolados Cu<sup>T</sup> não são precursores de isolados Cu<sup>R</sup>, tampouco representam uma ameaça à sustentabilidade do uso de bactericidas à base de cobre para o manejo do cancro cítrico nos pomares.

**Palavras-chave:** Homeostase de cobre, plasmídeo grande, *cohLAB*, *copLAB*, *copABCD*, transferência horizontal.



## Description of copper tolerant strains of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and genotypic comparison with sensitive and resistant strains

**Author:** Tamiris Garcia da Silva

**Advisor:** Dr. Franklin Behlau

### Abstract

The application of copper-based bactericides is the main measure for control of citrus canker in regions where the disease is endemic. However, this measure may lead to the development of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) resistant to copper (Cu<sup>R</sup>). The characterization of copper sensitivity of *X. citri* strains from Paraná did not reveal the existence of Cu<sup>R</sup>, but copper tolerant (Cu<sup>T</sup>) isolates. The objective of this study was to compare the genetic determinants that differentiate the Cu<sup>T</sup> strains from the sensitive (Cu<sup>S</sup>) and Cu<sup>R</sup> strains. Cu<sup>T</sup> strains support intermediate concentrations of copper in comparison to Cu<sup>S</sup> and Cu<sup>R</sup>. Cu<sup>T</sup> strains were able to grow on culture medium containing 150 to 200 mg/L copper sulfate pentahydrate, whereas Cu<sup>S</sup> and Cu<sup>R</sup> isolates were grown on medium with up to 125 mg/L and up to 400-500 mg/L, respectively. Cu<sup>T</sup> strains lack the copper resistance genes present on Cu<sup>R</sup> and the large plasmids ( $\geq 200$  kpb) that normally carry these genes. Cu<sup>T</sup> strains differed from Cu<sup>S</sup> isolates by the higher expression of the homologous chromosomal genes, *cohA* and *cohB*, in the presence of copper. Cu<sup>T</sup> strains are not precursors of Cu<sup>R</sup> *X. citri*, nor do they pose a threat to the efficient use of copper-based bactericides for management of citrus canker in orchards.

**Keywords:** Copper homeostasis, large plasmid, *cohLAB*, *copLAB*, *copABCD*, horizontal transfer.

**SUMÁRIO**

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	7
2.1 Isolados bacterianos.....	7
2.2 Sensibilidade ao cobre em meio sólido .....	8
2.3 Perfil plasmidial.....	9
2.4 Presença dos agrupamentos gênicos <i>copLAB</i> e <i>copABCD</i> .....	9
2.5 Transferência horizontal .....	10
2.6 Sequenciamento e comparação dos genes <i>cohLAB</i> .....	11
2.7 Expressão relativa dos genes <i>coh</i> .....	12
<b>3. RESULTADOS</b> .....	14
3.1 Sensibilidade ao cobre em meio sólido .....	14
3.2 Perfil plasmidial.....	15
3.3 Presença dos agrupamentos gênicos <i>copLAB</i> e <i>copABCD</i> .....	16
3.4 Transferência horizontal .....	17
3.5 Sequenciamento e comparação do agrupamento gênico <i>cohLAB</i> .....	20
3.6 Expressão relativa dos genes <i>coh</i> .....	21
3.7 Comparação geral.....	22
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	23
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	26
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	27

## 1. INTRODUÇÃO

A citricultura tem papel significativamente importante na economia mundial. Desde que as primeiras plantas cítricas foram introduzidas no Brasil, pelos portugueses, esta cultura apresenta uma história de sucessos e conquistas. O país detém atualmente mais da metade da produção mundial de suco de laranja e exporta 77% da produção, o que torna a citricultura uma das principais atividades do agronegócio nacional (Neves et al., 2010; FNP Consultoria e Comércio, 2016). No entanto, todo este potencial produtivo é constantemente ameaçado por uma gama de doenças e pragas, entre as quais destaca-se o cancro cítrico. Segundo levantamento realizado pelo Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), esta doença, apesar de ainda em expansão no estado de São Paulo (Behlau et al., 2016), causou a queda de 0,31% de frutos no parque citrícola paulista na safra 2017/2018, que corresponde a 1,5 milhões de caixas de 40,8 kg (Fundo de Defesa da Citricultura, 2018).

As principais consequências do cancro cítrico são desfolha de plantas, depreciação e queda prematura dos frutos, que resulta na redução da produção. Com a queda das folhas a área fotossintética da planta é comprometida, conseqüentemente pode diminuir a produtividade da safra corrente e também de safras futuras. Em frutos, o aparecimento de sintomas inviabiliza o comércio para consumo *in natura* que acarreta perdas econômicas para o produtor. Os sintomas podem aparecer em frutos de laranja com até aproximadamente 45 mm de diâmetro e a queda prematura de frutos afetados pela doença é maior nos meses que antecedem a colheita (Behlau & Belasque, 2014; Lanza et al., 2018).

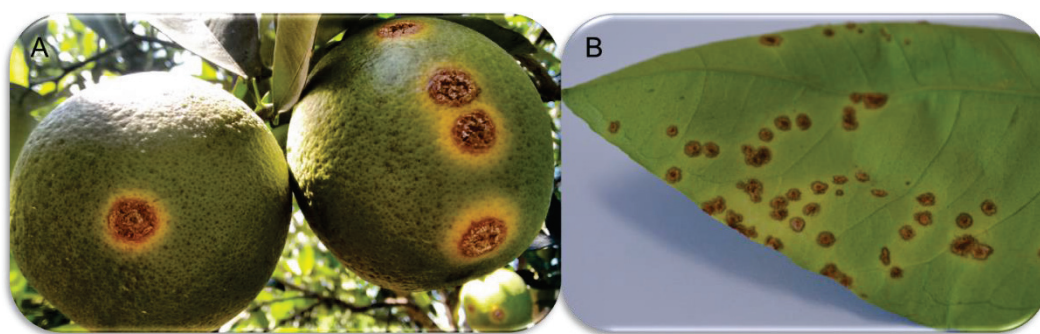
O cancro cítrico foi detectado pela primeira vez no Brasil no ano de 1957, no município de Presidente Prudente, São Paulo, após a observação de sintomas da doença em mudas de tangerina ‘Ponkan’ (*Citrus reticulata*) importadas por imigrantes japoneses (Bitancourt, 1957). O agente causal é a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*). Esta bactéria apresenta morfologia de bastonete, é Gram-negativa e produz o polissacarídeo goma xanthana, que confere à colônia aspecto mucoide. Este polissacarídeo ou biopolímero desempenha um papel importante na patogenicidade e contribui para a sobrevivência da bactéria, por proteger contra radiação UV, dessecação e congelamento (Meyer & Bogdanove, 2009).

Embora existam diferentes níveis de suscetibilidade, o cancro cítrico afeta todas as variedades comerciais de citros. *X. citri* pode sobreviver em lesões presentes em material vegetal em decomposição por meses e disseminar-se facilmente, contudo, para que ocorra

infecção a bactéria deve entrar em contato com os estômatos ou ferimentos no tecido da planta e acessar o interior da folha. Ferimentos mecânicos causados por equipamentos ou abrasão de partes da planta e aqueles causados por insetos como o minador dos citros são meios eficientes de entrada da bactéria na planta.

Com a introdução do minador dos citros (*Phyllocnistis citrella*) no Brasil em 1996, houve importante aumento na incidência da doença (Bergamin Filho et al., 2000; Gimenes-Fernandes et al., 2000). Embora o inseto não seja vetor da bactéria, os ferimentos provocados por ela facilitam a penetração do patógeno, intensificando a disseminação do cancro cítrico. Durante a alimentação, as larvas do minador dos citros rompem a cutícula e a epiderme expondo o mesófilo foliar, desta forma o hospedeiro torna-se mais suscetível à infecção (Chagas et al., 2001; Gottwald et al., 1997; Jesus Junior. et al., 2006).

Por meio dos ferimentos ou aberturas naturais a bactéria coloniza o mesófilo foliar e leva ao desenvolvimento de sintomas, como lesões corticosas, geralmente salientes nas duas faces, circulares e frequentemente circundadas por um halo amarelo (Figura 1) (Behlau & Belasque, 2014). A redução da produção de clorofilas a e b, xantofila e caroteno levam a formação deste halo nessas regiões (Padmanabham et al., 1974). A disseminação do patógeno entre plantas e pomares ocorre por meio de respingos de chuva a curtas e a longas distâncias quando associada à ocorrência de rajadas de vento ou pela ação do homem, mediante transporte de material vegetal infectado e material de colheita (Danós et al., 1984; Gottwald et al., 1992).



**Figura 1.** Sintomas de cancro cítrico em fruto (A) e folha (B) de laranja doce (*Citrus sinensis*).  
Fonte: Fundecitrus.

Em áreas endêmicas realiza-se o manejo do cancro cítrico, baseado no uso de genótipos menos suscetíveis, quebra-ventos, controle do minador dos citros e, principalmente, aplicação de bactericidas a base de cobre (Behlau et al., 2010; Behlau et al. 2017; Scapin et al., 2015; Graham et al., 2010; Graham et al., 2011; Graham et al., 2016). Entretanto, em

áreas com baixa incidência de plantas afetadas pela doença, o emprego de medidas de controle baseadas em exclusão e erradicação é a estratégia utilizada na prevenção do cancro cítrico (Gottwald et al., 2001). Esta estratégia foi adotada no estado de São Paulo por quase 60 anos. De 1999 a 2009 a planta doente e um raio de 30 metros eram eliminados, ou em alguns casos o talhão todo era eliminado. Entre 2010 e 2012 somente o raio de 30 metros era eliminado, e a partir de 2013 somente a planta doente era eliminada e realizadas aplicações frequentes de produtos à base de cobre em um raio de 30 metros a partir da planta eliminada. Com a utilização sucessiva de protocolos de erradicação menos rigorosos, houve um aumento drástico da ocorrência da doença no parque citrícola paulista (Barbosa et al., 2001; Behlau & Belasque, 2014; Behlau et al., 2016) e a adesão ao manejo do cancro cítrico no estado tornou-se inevitável a partir de 2017.

Em maio de 2018, foi publicada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), uma nova legislação que regulamenta o controle do cancro cítrico no país, e estabelece por meio da Instrução Normativa nº 21, quatro cenários: i) Área sem ocorrência; ii) Área Livre da Praga; iii) Área sob Erradicação ou Supressão e; iv) Área sob Sistema de Mitigação de Risco (SMR). No estado de São Paulo está sendo adotada como medida de controle oficial, de acordo com a Resolução SAA 10 de 20/2/2017, o SMR. Este é um sistema de certificação que visa minimizar as perdas no campo pela doença e os riscos de disseminação do patógeno a áreas indenizadas. Apesar desta certificação ser exigida apenas para produtores de fruta de mesa, produtores de fruta para indústria também devem empregar as medidas de controle da doença (Brasil, 2018).

O uso do cobre tem sido a base na prevenção e controle químico de cancro cítrico e outras doenças no Brasil e em outros países, como na Argentina (Leite Júnior, 1990; Leite Júnior, 2000; Sales Júnior et al., 2005; Behlau et al., 2008, Behlau et al., 2017; Scapin et al., 2015; Graham et al., 2011; Graham et al., 2016; Canteros et al., 2017). As formulações de cobre fixo contendo oxiclreto de cobre, hidróxido de cobre ou óxido cuproso são as mais utilizadas e visam a proteção de brotações e frutos contra infecções causadas por *X. citri* (Behlau et al., 2008; Behlau et al., 2010; Graham et al., 2010; Graham et al., 2016; Stein et al., 2014). As partículas de cobre formam um filme sobre a superfície da folha ou do fruto, impedindo ou dificultando desta maneira a penetração de *X. citri* por aberturas naturais, estômatos ou ferimentos. O filme de cobre atua como reservatório que libera lentamente íons de cobre, tóxicos para as células microbianas, em contato com água e pH baixo (Menkissoglu & Lindow, 1991). A eficácia destes bactericidas está diretamente relacionada com a frequência de aplicação, dose de cobre metálico, nível de resistência da variedade ou espécie,

condições ambientais para o desenvolvimento da doença e a adoção de outras medidas de controle (Gottwald et al., 2002; Stall & Seymour, 1983; Stein et al., 2007; Scapin et al., 2015; Behlau et al., 2010; Behlau et al., 2017). Para o controle satisfatório da doença é necessário a realização de aplicações frequentes do bactericida durante os meses da primavera e verão em intervalos de aproximadamente 21 dias (Behlau et al., 2010). No entanto, o uso prolongado destes bactericidas pode induzir o desenvolvimento de linhagens bacterianas de *X. citri* resistentes a este metal (Behlau et al., 2011, Behlau et al., 2013; Richard et al., 2017) e comprometer a eficácia do controle químico.

O cobre é um dos elementos essenciais ao metabolismo celular em organismos procariotos e eucariotos, e está presente em minerais como óxidos, sulfetos e carbonatos (Hoshino et al., 1999). Este metal age como cofator de metaloproteínas e enzimas envolvidas na respiração, como oxigenases e de proteínas de transporte de elétrons, ATPases. Contudo, em altas concentrações o cobre torna-se citotóxico por induzir a produção de radicais livres e, conseqüentemente, danificar membranas lipídicas e DNA (Chillappagari et al., 2010; Hiniker et al., 2005; Macomber & Imlay, 2009). Todavia, muitas bactérias possuem mecanismos de resistência que possibilitam a sobrevivência em concentrações elevadas deste metal, por meio de sistemas de distribuição, destoxificação e efluxo de cobre (Melano & Cooksey, 1988; Bender et al., 1990).

Isolados resistentes ao cobre ( $\text{Cu}^{\text{R}}$ ) foram detectados em populações de várias espécies de bactérias fitopatogênicas, como *Pseudomonas syringae* pv. tomato, *X. arboricola* pv. juglandis, *X. euvesicatoria*, *X. perforans*, *X. gardneri* (Lee et al., 1994; Behlau et al., 2013; Cooksey et al., 1987), *X. axonopodis* pv. vesicatoria (Voloudakis et al., 1993; Voloudakis et al., 2005; Basim et al., 2005), *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* (Behlau et al., 2011) e *X. citri* (Behlau et al., 2011; Richard et al., 2017). Aplicações frequentes de cobre levam a um direcionamento evolutivo das populações bacterianas, por meio da pressão de seleção. Uma vez que os determinantes genéticos da resistência ao cobre são adquiridos por algum indivíduo por meio da conjugação, que consiste na troca de material genético de uma bactéria para outra, pode ocorrer um aumento gradativo da frequência desta linhagem na população do patógeno exposta ao metal (Bender et al., 1990; Sundin et al., 1989; Stall et al., 1986). A resistência ao cobre em bactérias é regulada por vários genes, desta forma é baixa a probabilidade do surgimento de bactérias  $\text{Cu}^{\text{R}}$  por meio de mutações espontâneas (Cooksey 1990).

Em meados da década de 90 foi relatado pela primeira vez na Argentina uma linhagem de *X. citri*  $\text{Cu}^{\text{R}}$ , originária de viveiros que receberam aplicações regulares de bactericidas à base

de cobre (Canteros, 1999). Mais recentemente, isolados *X. citri* Cu<sup>R</sup> também foram detectados nos territórios franceses de Ilha Reunião e Martinica (Richard et al., 2017). Na maioria dos isolados caracterizados de *X. citri* Cu<sup>R</sup> e de outras espécies do gênero, a resistência ao cobre é conferida pelo agrupamento gênico *copLAB* revelados por meio da clonagem e caracterização genética da resistência (Behlau et al., 2011). Estes genes foram detectados em plasmídeo, o que facilita sua transferência entre os isolados mediante transferência horizontal por conjugação. Este é o principal mecanismo para a aquisição de resistência ao cobre por bactérias, incluindo *X. citri* (Behlau et al., 2011; Behlau et al., 2012; Behlau et al., 2013). A expressão destes genes permite que a bactéria seja protegida dos efeitos nocivos do cobre. Voloudakis et al. (2005) observaram que em *X. vesicatoria* resistente ao cobre, a transcrição de *copA* depende da tradução de *copL*, portanto, este gene possivelmente regula a expressão de *copA* e *copB*, os quais por sua vez, codificam proteínas de ligação ao cobre. Desta forma, a resistência acontece por meio do sequestro de íons de cobre por estas proteínas, as quais são acumuladas no periplasma da célula bacteriana (Cooksey, 1990; Voloudakis et al., 2005).

Recentemente, isolados de *X. citri* Cu<sup>R</sup> contendo os genes de resistência do agrupamento gênico *copABCD* no genoma plasmidial também foram identificados (Richard et al., 2017). Estes genes foram previamente descritos em isolados de *X. arboricola* pv. *juglandis* Cu<sup>R</sup> (Lee et al., 1994) e *Pseudomonas syringae*. A caracterização da resistência em *P. syringae* revelou mecanismo de destoxificação de cobre semelhante ao conferido pelo *copLAB* em *Xanthomonas* (Cooksey & Azad, 1992). Os genes *copA* e *copC* são responsáveis por codificar proteínas periplasmáticas que ligam o metal, portanto, são fundamentais para a resistência de *P. syringae* em altas concentrações de cobre. Os genes *copB* e *copD* codificam proteínas de membrana externa e interna, respectivamente, responsáveis pela resistência completa ao metal (Cooksey, 1993). Na grande maioria dos isolados de *Xanthomonas* Cu<sup>R</sup> os genes de resistência estão localizados em plasmídeos grandes ( $\geq 200$  kpb) (Behlau et al., 2012; Stall et al., 1986). No entanto, há relatos que indicam a ocorrência de genes de resistência ao cobre no cromossomo (Basim et al., 2005; Lee et al., 1994).

As bactérias também apresentam mecanismos de homeostase de cobre (Osman & Cavet, 2008). Enquanto a homeostase está presente em todas as bactérias e é responsável por manter o equilíbrio dos níveis essenciais de cobre no meio intracelular (Argüello et al., 2013), a resistência ao cobre tem distribuição mais restrita e é responsável por proteger a célula bacteriana do efeito nocivo causado pelo excesso do metal (Cooksey & Azad, 1992). Presentes no cromossomo de bactérias do gênero *Xanthomonas* sensíveis (Cu<sup>S</sup>) e Cu<sup>R</sup>, os genes *cohL*, *cohA* e *cohB* são homólogos aos genes *cop* de resistência (Behlau et al., 2011,

2016), e estão relacionados ao metabolismo essencial ou homeostase de cobre nestes fitopatógenos. A similaridade de nucleotídeos entre os genes de resistência *copL*, *copA* e *copB* do isolado Cu<sup>R</sup> A44 com os genes homólogos cromossomais *cohL*, *cohA* e *cohB* do isolado Cu<sup>S</sup> 306, corresponde a 47%, 68% e 54%, respectivamente (Silva et al., 2002; Behlau et al., 2011). Devido à similaridade, os genes *coh* (homeostase) foram caracterizados equivocadamente em estudos prévios como genes *cop* (resistência) (Teixeira et al., 2008; Hsiao et al., 2011). Desta forma, é importante a diferenciação correta destes dois grupos afim de evitar equívocos em anotações e caracterização de isolados quanto a sensibilidade ao cobre (Behlau et al., 2016).

A grande maioria dos estudos prévios caracterizaram a sensibilidade dos isolados bacterianos ao cobre de forma qualitativa, como sensíveis ou resistentes (Behlau et al., 2013; Teixeira et al., 2008; Meneguim et al., 2007; Richard et al., 2017). Neste trabalho, no entanto, a sensibilidade ao cobre foi estudada de forma quantitativa e levou a identificação de isolados de *X. citri* com sensibilidade intermediária ao metal, denominados de tolerantes (Cu<sup>T</sup>). Assim, além de reportar de forma inédita a existência de isolados de *X. citri* Cu<sup>T</sup>, este trabalho teve como objetivo comparar os determinantes genéticos que diferenciam os isolados Cu<sup>T</sup> dos Cu<sup>S</sup> e Cu<sup>R</sup>.



## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Isolados bacterianos

Os isolados de *X. citri* Cu<sup>T</sup> foram obtidos no presente estudo. No total foram analisadas 47 amostras de folhas coletadas em 2011 e 2012 de pomares de laranja doce (*Citrus sinensis*) de diferentes variedades e idades, regularmente tratados com produtos a base de cobre. Os pomares amostrados estão localizados em cinco municípios do Noroeste do Paraná (Alto Paraná, Floraí, Guairaçá, Paranavaí e Rondon). Cada amostra foi composta por 20 folhas maduras com lesões de cancro cítrico coletadas aleatoriamente em plantas de um talhão. Os isolados referência Cu<sup>S</sup> e Cu<sup>R</sup> foram obtidos de outras fontes ou estudos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* utilizados neste estudo.

Isolados <sup>a</sup>	Características relevantes <sup>b</sup>	Hospedeiro e local de origem	Fonte ou referência <sup>c</sup>
306	Cu <sup>S</sup>	Laranja, Paranavaí, Paraná, Brasil	Silva et al., 2002
306-RE	Cu <sup>S</sup> , Rif <sup>R</sup> ; Esp <sup>R</sup>	Laranja, Paranavaí, Paraná, Brasil	Este estudo
FDC75	Cu <sup>S</sup>	Laranja, Casa Branca, São Paulo, Brasil	IBSBF 1421
A44	Cu <sup>R</sup>	Pomelo, Bella Vista, Corrientes, Argentina	Behlau et al., 2011
Xcc-10-4167	Cu <sup>R</sup>	Pomelo, Três Lagunas, Formosa, Argentina	Canteros, B. I.
LM199	Cu <sup>R</sup>	Laranja, Argentina	Richard et al., 2017
FDC1666	Cu <sup>T</sup>	Laranja, Rondon, Paraná, Brasil	Este estudo
FDC1666-RE	Cu <sup>T</sup> , Rif <sup>R</sup> ; Esp <sup>R</sup>	Laranja, Rondon, Paraná, Brasil	Este estudo
FDC1705	Cu <sup>T</sup>	Laranja, Paranavaí, Paraná, Brasil	Este estudo
FDC1707	Cu <sup>T</sup>	Laranja, Alto Paraná, Paraná, Brasil	Este estudo
FDC1707-RE	Cu <sup>T</sup> , Rif <sup>R</sup> ; Esp <sup>R</sup>	Laranja, Alto Paraná, Paraná, Brasil	Este estudo
FDC1733	Cu <sup>T</sup>	Laranja, Guairaçá, Paraná, Brasil	Este estudo

<sup>a</sup>FDC, Fundo de Defesa da Citricultura.

<sup>b</sup>Cu<sup>S</sup>, Cu<sup>T</sup>, Cu<sup>R</sup>, isolado sensível, tolerante e resistente ao cobre, respectivamente. Rif<sup>R</sup> (R), Esp<sup>R</sup> (E), isolado resistente aos antibióticos rifampicina e espectinomicina, respectivamente.

<sup>c</sup>IBSBF, Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, Brasil; Canteros, B. I., Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária, Bella Vista, Argentina.

No laboratório as folhas foram cortadas e colocadas em erlenmeyers contendo 10 mL/grama de folha de meio MGY líquido (manitol 10 g/L, L-ácido glutâmico 2 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 g/L, NaCl 0,2 g/L, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,2 g/L, extrato de levedura 1 g/L) acrescido com 1 mg/L de sulfato de cobre pentahidratado (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) e 1% de peptona (Behlau et al., 2012). Os frascos foram mantidos em incubadora sob agitação orbital a 28°C e 180 rpm por 2

horas (h) para promover a exsudação bacteriana. As suspensões obtidas foram diluídas 1/10 a 1/1000 em água autoclavada. Posteriormente, 100 µL de cada diluição foram plaqueados em meio de cultura semi-seletivo (Behlau et al., 2012) com cobre (MGY-KCH+Cu) e sem cobre (MGY-KCH). O elemento cobre (Cu) foi adicionado ao meio na concentração de 100 mg de sulfato de cobre pentahidratado/L de água. Enquanto o meio com cobre foi usado para selecionar isolados de *X. citri* não sensíveis ao metal, o meio desprovido de cobre serviu para confirmar a presença e quantificar a população total de *X. citri* presente na suspensão. As placas foram avaliadas após 96 h de incubação a 28°C pela contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de *X. citri* (Behlau et al., 2012). A identidade dos isolados de *X. citri* obtidos em meio MGY-KCC+Cu foi confirmada por teste de patogenicidade realizado por meio de infiltração de suspensão bacteriana na concentração de 10<sup>8</sup> UFC/mL em folhas de laranja ‘Hamlin’ (Baptista et al., 2010) e por teste ELISA utilizando fita imunológica (ImmunoStrip®, Agdia, Elkhart, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante.

## 2.2 Sensibilidade ao cobre em meio sólido

O nível de sensibilidade dos isolados Cu<sup>T</sup> obtidos neste estudo de amostras do campo foi comparado em meio sólido com isolados padrões Cu<sup>S</sup> 306 (Silva et al., 2002) e FDC75 e Cu<sup>R</sup> A44 (Behlau et al., 2011) e Xcc-10-4167. Para isso, colônias individuais dos isolados crescidas a 28°C durante 24 h em meio de cultura NA (extrato de carne 3g/L, peptona 5g/L, NaCl 5g/L e ágar 15g/L, pH 7,0) foram transferidas para placas contendo meio NA suplementado com baixa e não inibitória concentração (20 mg/L) de sulfato de cobre pentahidratado, com objetivo de induzir a expressão dos possíveis genes de resistência ou tolerância ao cobre dos isolados (Basim et al., 2005). Posteriormente, suspensões bacterianas provenientes das colônias desenvolvidas em meio NA+Cu foram preparadas a 10<sup>8</sup> UFC/mL e transferidas (10 µL) sobre placas contendo meio MGY suplementado com diferentes concentrações de sulfato de cobre pentahidratado (25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500 mg/L) (Behlau et al., 2012). As placas foram incubadas a 28°C por 96 h e avaliadas quanto à presença de crescimento bacteriano. Os isolados foram classificados como Cu<sup>S</sup>, Cu<sup>T</sup> ou Cu<sup>R</sup> ao cobre quando capazes de crescer em meio com ≤125, >150 a <200 e ≥500 mg sulfato de cobre pentahidratado/L, respectivamente. O crescimento bacteriano foi considerado confluyente ou parcial quando indicam a formação de massa bacteriana homogênea ou heterogênea sobre o meio sólido na área da placa que recebeu a suspensão bacteriana, respectivamente (Behlau et al., 2012). Quatro isolados tolerantes ao cobre obtidos

neste estudo foram utilizados na comparação genotípica com isolados referência Cu<sup>S</sup> e Cu<sup>R</sup> (Tabela 1).

### 2.3 Perfil plasmidial

Para analisar o perfil plasmidial dos isolados foi realizada extração de DNA plasmidial pelo método de Kado & Liu (1981) com modificações (Minsavage et al., 1990). Para isso os isolados de *X. citri* foram inoculados em 4 mL de meio de cultura LP (contendo por litro, 7 g de levedura e 7 g de peptona, pH 7,0) e incubados a 28°C sob agitação de 200 rpm, por aproximadamente 16 h. Após o crescimento bacteriano, as suspensões bacterianas foram diluídas em água deionizada estéril e as respectivas concentrações ajustadas a aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/mL em espectrofotômetro (0,3 de absorbância a 600 nm).

Em seguida, as suspensões foram centrifugadas em um volume de 1,5 mL por 2 minutos, e o precipitado foi ressuspendido em 1 mL de água deionizada estéril e centrifugado novamente por 2 minutos. Ao precipitado foi adicionado 50 µL de tampão TAE 1X (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 40 mM, EDTA 1 mM) e 350 µL de solução de lise fresca (10 mL de água destilada aquecida a 30°C, 0,06 g Tris-base, 0,3 g SDS, 0,33 g NaCl e 0,4 mL NaOH 1N), seguido de homogeneização e incubação por 15 minutos a 28°C. Na sequência, foi realizada a adição de 800 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), homogeneização até a formação de emulsão de cor branca e centrifugação por 8 minutos a 13000 rpm em temperatura ambiente. A um novo tubo foram transferidos 50 µL da camada aquosa superior. Para averiguar o perfil plasmidial foi realizada eletroforese em gel de agarose 0,5% com um volume de 20 µL, preparado em tampão TAE 1X, corado com brometo de etídeo (0,1 µg/mL), e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado em sistema digital de fotodocumentação.

### 2.4 Presença dos agrupamentos gênicos *copLAB* e *copABCD*

Para analisar a presença de genes de resistência a cobre, os isolados selecionados foram submetidos à extração de DNA bacteriano pelo método de CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio) com modificações (Ausubel et al., 1995) e à análise de PCR. *Primers* (oligonucleotídeos iniciadores) específicos para cada gene dos agrupamentos *copLAB* (Behlau et al., 2011; 2013) e *copABCD* (Richard et al., 2017) foram utilizados, e desenhados com base nos isolados *X. citri* Cu<sup>R</sup> A44 e LM199, respectivamente. Estes dois isolados de *X.*

*citri* foram utilizados como controles positivos para a presença dos genes e o isolado de *X. citri* Cu<sup>S</sup> 306 como controle negativo para ausência dos genes.

As análises de PCR para os genes *copLAB* foram elaboradas em um volume total de 25 µL em termociclador Eppendorf modelo Mastercycler. Nesta análise, foram utilizados 100 ng de DNA genômico molde, 1 U (unidade) de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies), tampão da enzima 1X, 0,2 mM de dNTPs (2'- desoxinucleotídeos 5'-trifosfatos), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 0,2 µM de cada *primer* (Macrogen). O programa utilizado para as ampliações constitui-se de um ciclo de desnaturação inicial a 95°C/5 minutos, seguido de 30 ciclos a 95°C/30 segundos, 60°C/30 segundos e 72°C/45 segundos e, um ciclo de extensão final a 72°C/10 minutos (Behlau et al., 2011).

Para os genes *copABCD* as análises de PCR foram elaboradas em um volume total de 20 µL em termociclador Eppendorf modelo Mastercycler. Como molde foram utilizados 50 ng de DNA genômico, tampão da enzima 1X, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µM de cada *primer* (Macrogen), 3% de DMSO (dimetilsulfóxido) e 1 U de enzima DNA polimerase de alta fidelidade (Phusion, Thermo Scientific). O programa utilizado para as ampliações constitui-se de um ciclo de desnaturação inicial a 98°C/30 segundos, seguido de 30 ciclos a 98°C/10 segundos, 68°C/10 segundos para os genes *copA*, *copB* e *copD* e 64°C/10 segundos para o gene *copC*, 72°C/50 segundos e um ciclo de extensão final a 72°C/10 minutos (Richard et al., 2017). Os produtos gerados foram averiguados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X, corado com brometo de etídeo (0,1 µg/mL), visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados em sistema digital de fotodocumentação.

## 2.5 Transferência horizontal

Nos ensaios de conjugação os isolados mutantes resistentes a rifampicina e a espectinomicina (RE), Cu<sup>S</sup> 306-RE, Cu<sup>T</sup> FDC1666-RE e FDC1707-RE obtidos neste estudo segundo Azevedo (1963) foram utilizados como receptores e os isolados Cu<sup>R</sup> A44 e LM199, e Cu<sup>T</sup> FDC1666, FDC1705, FDC1707 e FDC1733 foram utilizados como doadores (Tabela 1). Os isolados Cu<sup>T</sup> foram utilizados como doadores e receptores para avaliar a capacidade de transferência da tolerância ao isolado sensível ao cobre e a existência de efeito aditivo de genes de resistência ao cobre em isolados Cu<sup>T</sup> transconjugantes, respectivamente.

Os isolados foram cultivados conjuntamente em meio NA suplementado com sulfato de cobre pentahidratado (20 mg/L) (Basim et al., 2005) e mantidos a 28°C por 24 h. Uma suspensão bacteriana proveniente de colônias conjugadas foi preparada em água de torneira

autoclavada a uma concentração aproximada de  $10^8$  UFC/mL. Posteriormente, essa suspensão foi plaqueada em meio MGY acrescido de 80 mg/L de rifampicina, 150 mg/L de espectinomicina, 200 mg/L de sulfato de cobre pentahidratado para os doadores Cu<sup>R</sup> (Basim et al., 2005) e 175 mg/L de sulfato de cobre pentahidratado para os doadores Cu<sup>T</sup>, para seleção de transconjugantes.

Para quantificar a população do isolado receptor, 100 µL das diluições  $10^{-4}$  e  $10^{-6}$  da suspensão obtida foi plaqueada em meio NA suplementado com rifampicina e espectinomicina nas mesmas concentrações citadas acima e incubado a 28°C por 72 h. Em seguida, foi determinada a frequência de conjugação por meio da razão entre o número de UFC transconjugantes obtidas e a população total do isolado receptor recuperado por mL de suspensão da conjugação.

O nível de sensibilidade dos transconjugantes ao cobre foi realizado conforme descrito anteriormente e comparado com isolados receptores Cu<sup>S</sup> 306, Cu<sup>T</sup> FDC1666 e FDC1707 e isolados doadores Cu<sup>R</sup> A44 e LM199.

## 2.6 Sequenciamento e comparação do grupo de genes *cohLAB*

Com o objetivo de comparar as sequências nucleotídicas do grupo de genes *cohLAB* entre os isolados estudados, os mesmos foram submetidos inicialmente à análise de PCR com os *primers* dos genes *cohLAB* (Tabela 2) desenhados por meio do software OligoPerfect Designer (Invitrogen Life Technologies). Os produtos da PCR foram purificados com o kit “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System”, de acordo com as recomendações do fabricante (Promega). Para a reação de sequenciamento foram utilizados os *primers* dos genes *cohLAB* (Tabela 2) em equipamento sequenciador (Macrogen, Korea). Os cromatogramas obtidos foram analisados no software CodonCode Aligner versão 7.1.2 e as sequências de nucleotídeos geradas foram comparadas pelo algoritmo Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>). Cada análise de PCR, reação de sequenciamento e análise das sequências foram realizadas em triplicata, para cada isolado.

**Tabela 2.** *Primers* utilizados para amplificação e sequenciamento do agrupamento gênico *cohLAB* de isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

<i>Primer</i>	Sequência (5' _3')	Localização <sup>a</sup>
cohLABF	CCAGGCGGTGCTTGAGGCTG	Externa
cohLABR	CGCTGTTGCCGTCGTGATAGACC	Externa
cohIn3	GCGCCGCTTCGTCCAGG	Interna
cohIn5	AACCGCTCGGCCAGGATG	Interna
cohIn7	ATGGAGGAGGCACCGCAG	Interna

<sup>a</sup>Localização dos *primers* em relação ao do agrupamento gênico *cohLAB*. *Primers* externos foram utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes; *primers* internos foram utilizados apenas para sequenciamento.

## 2.7 Expressão relativa dos genes *coh*

Para analisar o nível de expressão dos genes *coh*, os isolados foram previamente cultivados por 24 h a 28°C sob agitação de 200 rpm em meio de cultura líquido LP, sem e com adição de sulfato de cobre pentahidratado (40 mg/L). Posteriormente, as suspensões bacterianas foram ajustadas a uma concentração de 10<sup>8</sup> UFC/mL e precipitadas por centrifugação (5000 rpm, 10 minutos, 4°C), em seguida foi adicionado 1 mL de Trizol (ThermoFisher). Após 5 minutos no gelo, foi adicionado ao precipitado 200 µL de clorofórmio, agitado vigorosamente por 20 segundos, incubado por 3 minutos no gelo e centrifugado (12000 rpm, 15 minutos, 4°C). Em seguida, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo onde foi adicionado 250 µL de isopropanol e 250 µL de tampão de precipitação (0,8 M de citrato de sódio e 1,2 M de cloreto de sódio). A mistura foi mantida em gelo durante 10 minutos e centrifugada (12000 rpm, 15 minutos, 4°C). O precipitado foi lavado com 250 µL de etanol a 70% com DEPC (pirocarbonato dietil) a 1% e centrifugado (12000 rpm, 5 minutos, 4°C). As amostras foram secas e ressuspensas em 50 µL de água com DEPC. A concentração e a pureza do RNA das amostras foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop 1000, Thermo Scientific).

A concentração das amostras de RNA foi ajustada em 20 µL a 50 ng/µL, o DNA genômico destas amostras foi eliminado utilizando o Kit Turbo DNA-free (Ambion), seguindo as instruções do fabricante, e armazenado a -80°C. Para a conversão de RNA em cDNA, 5 µL das amostras foram adicionadas a um mix contendo 4,5 µM do *primer* N6 e 0,45 mM de dNTP, desnaturadas por 5 minutos a 70°C seguido de 5 minutos no gelo. Em seguida,

foi adicionado na mesma reação o mix contendo em um volume final de 20  $\mu\text{L}$ , 1 X tampão da enzima, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 40 U RNase OUT (Invitrogen Life Technologies), 1  $\mu\text{L}$  IMPROM II (Promega), e incubadas em termociclador (Mastercycler) utilizando ciclo de 5 minutos a 25°C, 1 h a 42°C e 15 minutos 70°C.

As análises de RT-qPCR foram realizadas utilizando 1  $\mu\text{L}$  de cDNA, 0,25  $\mu\text{M}$  de cada *primer* dos genes *cohL*, *cohA* e *cohB* (Tabela 3), 1 X SYBR Green Master Mix (Ambion), compondo um volume final de 12  $\mu\text{L}$ . As reações foram realizadas no termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems) com as seguintes condições: 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 57°C por 45 segundos. O nível de expressão dos genes foi normalizado com os endógenos *gyrA* e *gumB* (Li & Wang, 2014). A expressão relativa dos genes na presença e ausência de cobre foi calculada usando a fórmula  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  e determinada por RQ (quantificação relativa) (Livak & Schmittgen, 2001). Para cada um dos três genes foram realizados três ensaios e cada ensaio com três repetições técnicas (leitura de Ct da mesma amostra).

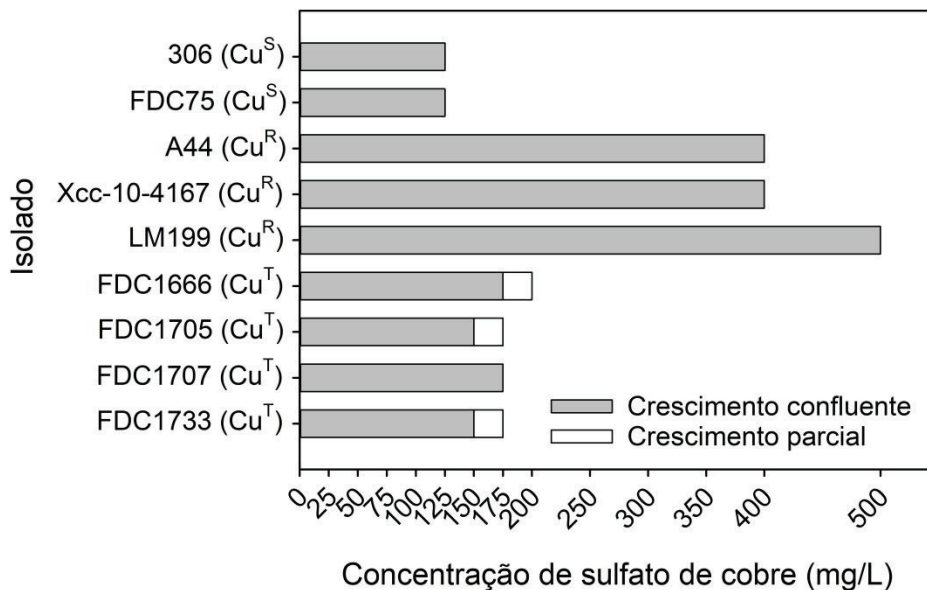
**Tabela 3.** *Primers* utilizados nas análises de qRT-PCR dos genes *cohLAB* de isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

<i>Primer</i>	Sequência (5' _ 3')	Gene
cohLF	AAACTGGGCAGCTGCGATT	<i>cohL</i>
cohLR	GTACGGCAGGCAAGGTCAAC	<i>cohL</i>
cohAF	ATCATTCCGCCAGCGAA	<i>cohA</i>
cohAR	GGTGCAGTGGCATTG	<i>cohA</i>
cohBF	GAGACCCCGGCATCATCTC	<i>cohB</i>
cohBR	CCTGCTTCATCGATTCATGGT	<i>cohB</i>

### 3. RESULTADOS

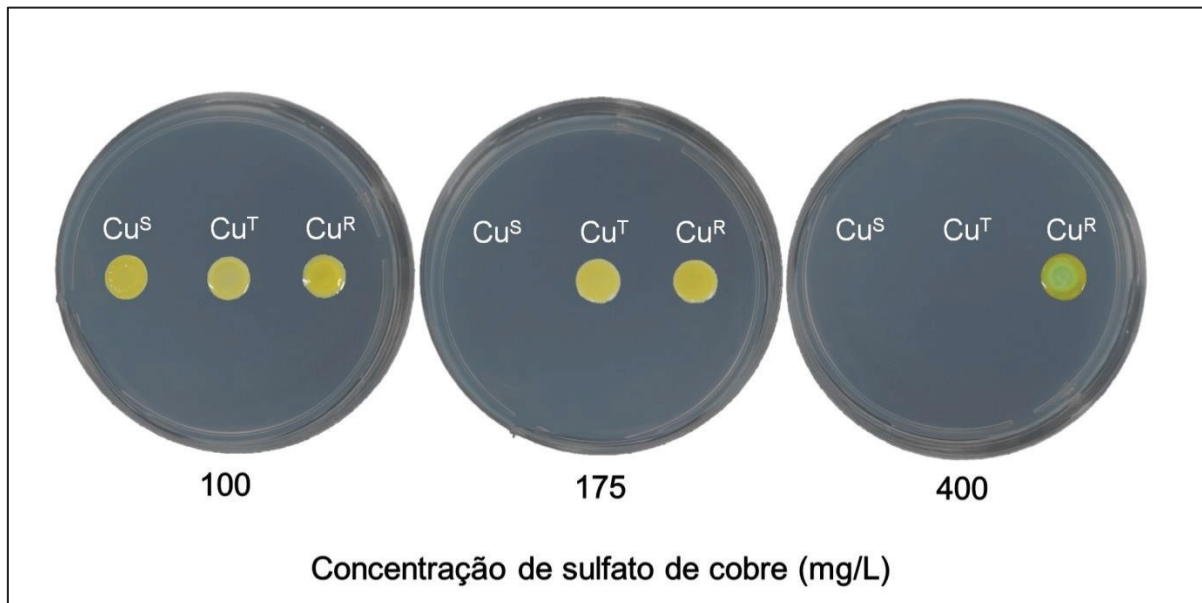
#### 3.1 Sensibilidade ao cobre em meio sólido

Dos 47 talhões avaliados 6 resultaram no isolamento de *X. citri* não sensíveis ao cobre, estes isolados apresentaram nível intermediário de sensibilidade ao metal e, por isso, foram denominados de Cu<sup>T</sup>. No total foram obtidos 22 isolados Cu<sup>T</sup>, sendo 6 do município de Rondon, 6 de Alto Paraná, 2 de Paranaíba, 6 de Guairacá e 2 de Terra Rica. Enquanto os isolados Cu<sup>R</sup>, utilizados como controles positivos, cresceram até 400-500 mg de cobre/L, e os isolados Cu<sup>S</sup>, utilizados como controles negativos, cresceram até 125 mg/L, os isolados Cu<sup>T</sup> cresceram até 150-200 mg/L (Figura 2 e 3).



**Figura 2.** Crescimento de isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* sensíveis (Cu<sup>S</sup>), tolerantes (Cu<sup>T</sup>) e resistentes (Cu<sup>R</sup>) ao cobre em meio de cultura sólido MGY suplementado com diferentes concentrações de sulfato de cobre pentahidratado. Crescimentos conflúente e parcial indicam a formação de camada bacteriana homogênea e heterogênea sobre o meio sólido na área que recebeu a suspensão bacteriana, respectivamente.





**Figura 3.** Crescimento dos isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306, FDC1666 e A44, sensível (Cu<sup>S</sup>), tolerante (Cu<sup>T</sup>) e resistente (Cu<sup>R</sup>) ao cobre, respectivamente. Em meio de cultura sólido MGY, suplementado com diferentes concentrações de sulfato de cobre pentahidratado.

### 3.2 Perfil plasmidial

Os isolados Cu<sup>R</sup> utilizados como controles apresentaram um plasmídeo grande, com tamanho de  $\sim \geq 200$  kpb. No entanto, para os isolados Cu<sup>T</sup> e Cu<sup>S</sup> não foram detectados plasmídeos grandes, que normalmente abrigam os genes de resistência ao cobre em *Xanthomonas*, contudo, apresentaram de um a três plasmídeos médios ou pequenos (Tabela 4).

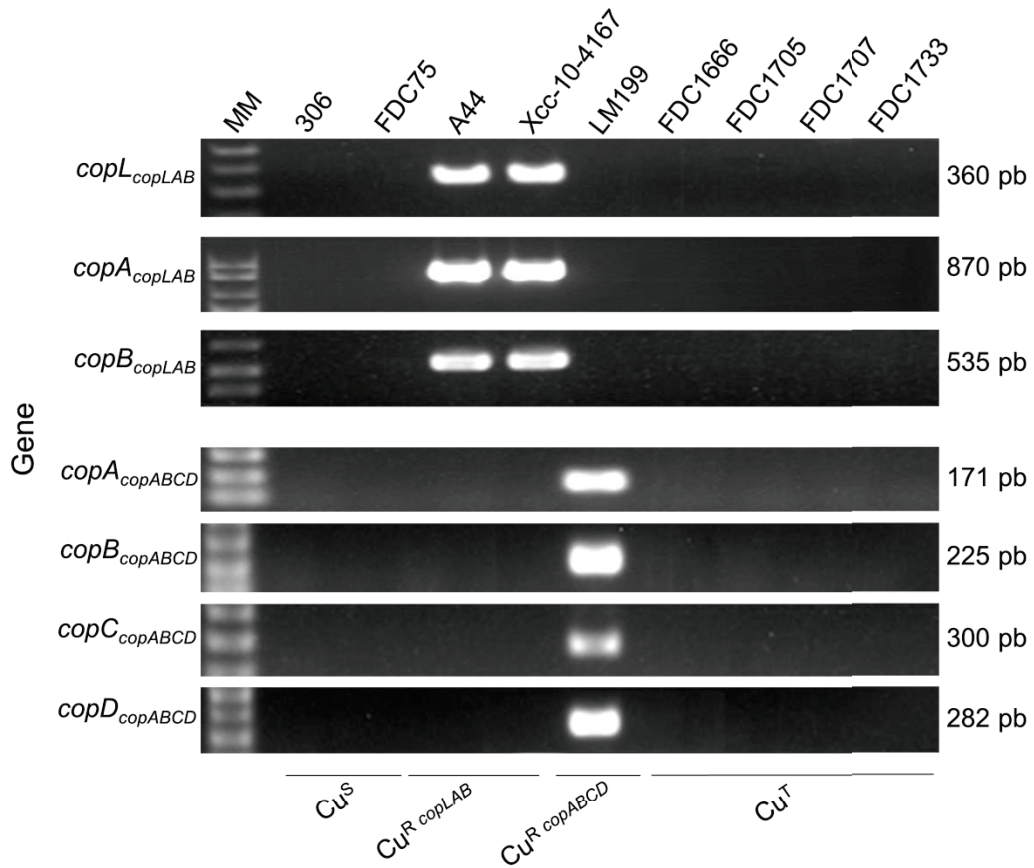
**Tabela 4.** Perfil plasmidial de isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* sensíveis (Cu<sup>S</sup>), tolerantes (Cu<sup>T</sup>) e resistentes (Cu<sup>R</sup>) ao cobre utilizados neste estudo.

Isolados	Nº. plasmídeos	Tamanho (kpb) <sup>a</sup>
306 (Cu <sup>S</sup> )	2	33 e 64
FDC75 (Cu <sup>S</sup> )	2	33 e 64
A44 (Cu <sup>R</sup> )	2	99 e 250
Xcc-10-4167 (Cu <sup>R</sup> )	3	33; 64 e 250
LM199 (Cu <sup>R</sup> )	2	64 e 197
FDC1666 (Cu <sup>T</sup> )	2	33 e 64
FDC1705 (Cu <sup>T</sup> )	2	33 e 64
FDC1707 (Cu <sup>T</sup> )	3	33; 64 e 99
FDC1733 (Cu <sup>T</sup> )	1	99

<sup>a</sup>Tamanho definido com base no marcador molecular e sequenciamento prévio dos plasmídeos (Gochez et al., 2018; Silva et al., 2002).

### 3.3 Presença dos agrupamentos gênicos *copLAB* e *copABCD*

Enquanto que para os isolados Cu<sup>R</sup> utilizados como controles positivos ocorreu amplificação dos genes de resistência dos agrupamentos gênicos *copLAB* ou *copABCD*, para os isolados Cu<sup>S</sup> e Cu<sup>T</sup> não foram obtidos produtos de PCR para os *primers* testados (Figura 4). Para os isolados controles Cu<sup>R</sup> Xcc-10-4167 e A44 foram observadas amplificações dos fragmentos de tamanho esperado de 360 pb para *copL*, 870 pb para *copA* e 535 pb para *copB* do agrupamento gênico *copLAB*. Para o isolado controle Cu<sup>R</sup> LM199, os fragmentos obtidos foram de 171 pb para *copA*, 225 pb para *copB*, 300 pb para *copC* e 282 pb para *copD* do agrupamento gênico *copABCD*. *Primers* desenhados para *copLAB* não amplificaram genes em isolados Cu<sup>R</sup> contendo *copABCD* e *primers* desenhados para *copABCD* não amplificaram genes em isolados Cu<sup>R</sup> contendo *copLAB* (Figura 4).



**Figura 4.** Amplificação via PCR de isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* sensíveis ( $\text{Cu}^{\text{S}}$ ), tolerantes ( $\text{Cu}^{\text{T}}$ ) e resistentes ( $\text{Cu}^{\text{R}}$ ) ao cobre, com *primers* específicos para os genes que compõe o agrupamento gênico *copLAB* e *copABCD*. MM, marcador molecular de massa 1 kpb (Invitrogen). Números à direita indicam o tamanho do fragmento em pares de base.

### 3.4 Transferência horizontal

Diferentemente do fenótipo de resistência, o fenótipo de tolerância ao cobre não foi transferido a isolados  $\text{Cu}^{\text{S}}$  por conjugação. Assim como os isolados  $\text{Cu}^{\text{S}}$ , os  $\text{Cu}^{\text{T}}$  também foram capazes de adquirir o fenótipo de resistência. A frequência de conjugação dos genes de resistência dos isolados  $\text{Cu}^{\text{R}}$  para os  $\text{Cu}^{\text{S}}$  e  $\text{Cu}^{\text{T}}$  variou de  $8,5 \times 10^{-7}$  a  $1,9 \times 10^{-3}$  células transconjugantes por célula receptora (Tabela 5).

**Tabela 5.** Frequência de conjugação da resistência ou tolerância ao cobre em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

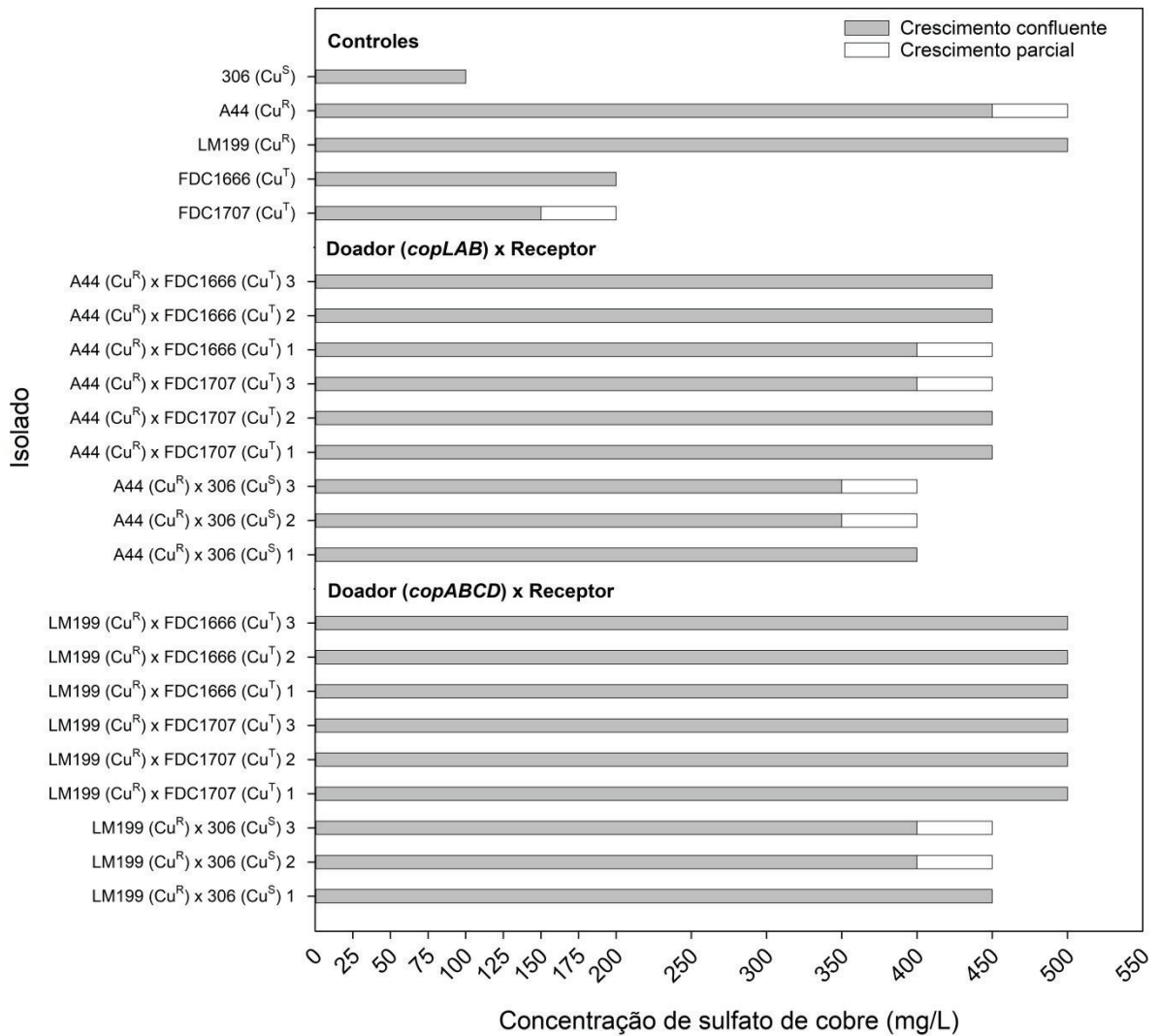
Isolado doador	Isolado receptor	Frequência de conjugação <sup>c</sup>
A44 (Cu <sup>R</sup> ) <sup>a</sup>	306-RE (Cu <sup>S</sup> ) <sup>b</sup>	1,2 x 10 <sup>-5</sup> a 8,5 x 10 <sup>-7</sup>
	FDC1666-RE (Cu <sup>T</sup> )	2,9 x 10 <sup>-5</sup> a 8,9 x 10 <sup>-7</sup>
	FDC1707-RE (Cu <sup>T</sup> )	1,9 x 10 <sup>-3</sup> a 1,9 x 10 <sup>-6</sup>
LM199 (Cu <sup>R</sup> )	306-RE (Cu <sup>S</sup> )	5,2 x 10 <sup>-4</sup> a 3,3 x 10 <sup>-4</sup>
	FDC1666-RE (Cu <sup>T</sup> )	1,2 x 10 <sup>-6</sup> a 6,9 x 10 <sup>-7</sup>
	FDC1707-RE (Cu <sup>T</sup> )	5,7 x 10 <sup>-4</sup> a 2,1 x 10 <sup>-6</sup>
FDC1666 (Cu <sup>T</sup> )	306-RE (Cu <sup>S</sup> )	0
FDC1705 (Cu <sup>T</sup> )	306-RE (Cu <sup>S</sup> )	0
FDC1707 (Cu <sup>T</sup> )	306-RE (Cu <sup>S</sup> )	0
FDC1733 (Cu <sup>T</sup> )	306-RE (Cu <sup>S</sup> )	0

<sup>a</sup>Cu<sup>S</sup>, Cu<sup>T</sup> e Cu<sup>R</sup> indicam isolados sensíveis, tolerantes e resistentes ao cobre, respectivamente.

<sup>b</sup>RE indicam isolados resistentes aos antibióticos Rifampicina e Espectinomicina.

<sup>c</sup>Número de células transconjugantes por célula receptora; baseado em três ensaios independentes.

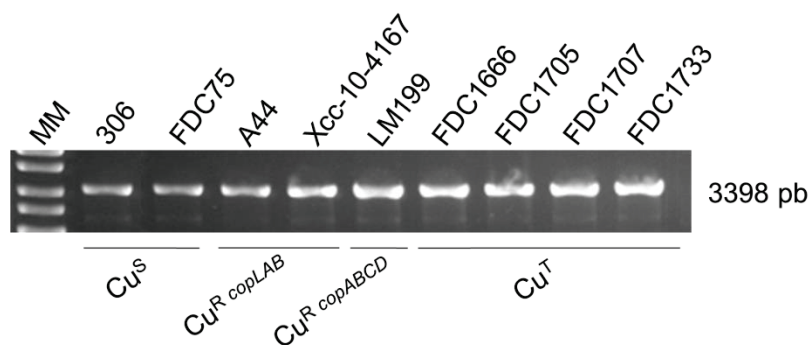
Todos os isolados transconjugantes apresentaram o fenótipo de resistência. No entanto, enquanto o nível de resistência dos transconjugantes com receptor Cu<sup>T</sup> foi similar ao isolado doador Cu<sup>R</sup>, a resistência de transconjugantes com receptor Cu<sup>S</sup> foi inferior àquela do isolado doador (Figura 5).



**Figura 5.** Crescimento de isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* transconjugantes e os isolados controle sensível (Cu<sup>S</sup>), tolerante (Cu<sup>T</sup>) e resistente (Cu<sup>R</sup>) ao cobre em meio de cultura MGY ágar suplementado com diferentes concentrações de sulfato de cobre pentahidratado. Os números de 1 a 3 no eixo y indicam diferentes repetições de transconjugantes da mesma conjugação.

### 3.5 Sequenciamento e comparação do agrupamento gênico *cohLAB*

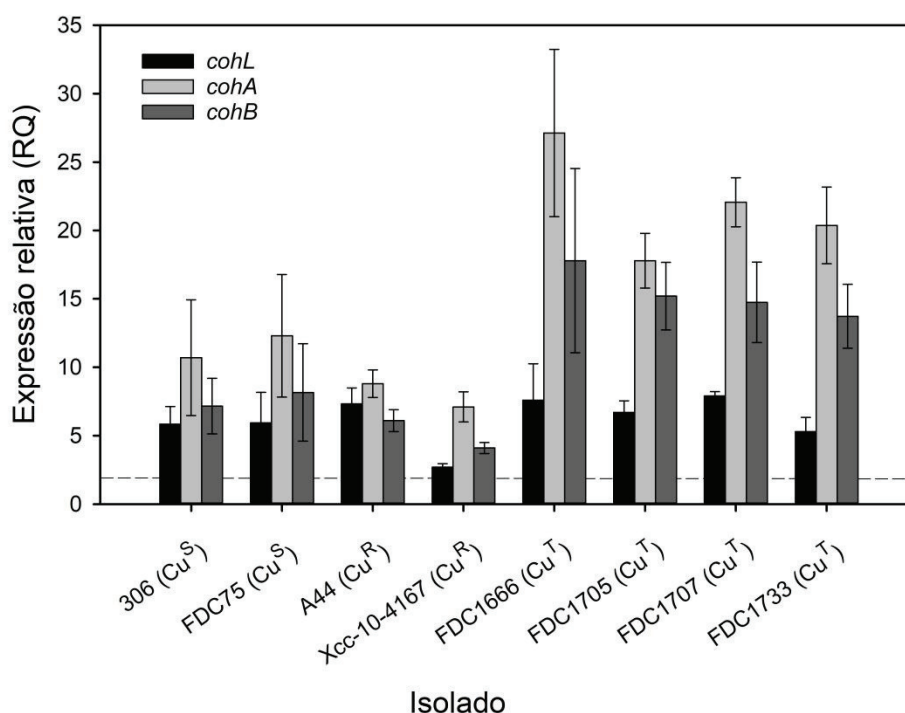
O agrupamento gênico *cohLAB* de 3398 pb foi amplificado em todos os isolados de *Xanthomonas* avaliados (Figura 6). O alinhamento e comparação da sequência de nucleotídeos destes genes revelou similaridade de 100% entre todos os isolados.



**Figura 6.** Amplificação do agrupamento gênico *cohLAB* por PCR de isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* sensíveis (Cu<sup>S</sup>), tolerantes (Cu<sup>T</sup>) e resistentes (Cu<sup>R</sup>) ao cobre. MM, marcador molecular de massa 1 kpb (Invitrogen). Número à direita indica o tamanho do fragmento em pares de base.

### 3.6 Expressão relativa dos genes *coh*

Todos os isolados apresentaram aumento significativo (RQ >2) de expressão dos genes *cohL*, *cohA* e *cohB* na presença de cobre. Enquanto a expressão relativa do gene *cohL* foi similar para todos isolados, a expressão dos genes *cohA* e *cohB* foi duas vezes maior para os isolados Cu<sup>T</sup> em relação aos Cu<sup>S</sup> (Figura 7).



**Figura 7.** Expressão relativa dos genes *cohL*, *cohA* e *cohB* de isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* sensíveis (Cu<sup>S</sup>), tolerantes (Cu<sup>T</sup>) e resistentes (Cu<sup>R</sup>) ao cobre cultivados em meio de cultura LP líquido contendo cobre (40 mg/L) em relação ao meio de cultura sem cobre. A linha pontilhada indica o nível mínimo significativo do aumento da expressão gênica (>2) (Vandesompele et al., 2002). Barras de erro indicam o erro padrão da média de três experimentos independentes.

### 3.7 Comparação geral

A análise conjunta dos experimentos conduzidos no presente estudo possibilitou a diferenciação dos isolados Cu<sup>T</sup> em relação aos isolados Cu<sup>S</sup> e Cu<sup>R</sup> (Tabela 6).

**Tabela 6.** Comparação de isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* sensíveis, tolerantes e resistentes ao cobre.

Característica	Fenótipo		
	Sensível	Tolerante	Resistente
Concentração máxima de cobre suportada (mg/L) <sup>a</sup>	≤125	150 a 200	400 a 500
Agrupamento gênico <i>copLAB</i> ou <i>copABCD</i> <sup>b</sup>	Ausente	Ausente	Presente
Presença de plasmídeo grande (≥200 kpb)	Não	Não	Sim
Conjugação do fenótipo	NA <sup>c</sup>	Não	Sim
Agrupamento gênico <i>cohLAB</i>	Presente	Presente	Presente
Expressão relativa de <i>cohA</i> e <i>cohB</i>	+	++ <sup>e</sup>	+

<sup>a</sup>Concentração de sulfato de cobre pentahidratado adicionado em meio de cultura MGY ágar.

<sup>b</sup>Com base nos *primers* dos genes *copLAB* (Behlau et al., 2011; 2013) e *copABCD* (Richard et al., 2017).

<sup>c</sup>NA, não aplicável.

<sup>e</sup>Expressão relativa média na presença de cobre duas vezes maior que em isolados sensíveis.



## 4. DISCUSSÃO

A análise quantitativa da sensibilidade de *X. citri* ao cobre identificou e caracterizou pela primeira vez isolados denominados Cu<sup>T</sup>. Enquanto isolados Cu<sup>S</sup> e Cu<sup>R</sup> cresceram em meio sólido suplementado com até 125 e até 400-500 mg de sulfato de cobre pentahidratado/L, respectivamente, isolados Cu<sup>T</sup> cresceram em meio com até 150-200 mg/L. Os níveis de tolerância foram estabelecidos relativamente com base em padrões de sensibilidade e resistência previamente descritos (Behlau et al., 2011; Behlau et al., 2012; Basim et al., 2005). A utilização de isolados padrão de referência para sensibilidade e resistência ao cobre que tenham sido caracterizados anteriormente é fundamental para correta identificação de isolados tolerantes. A maior parte dos estudos prévios relacionados caracterizaram a sensibilidade dos isolados ao cobre de forma binária, ou seja, como Cu<sup>R</sup> ou Cu<sup>S</sup>. Além disso, isolados Cu<sup>S</sup> têm sido erroneamente classificados como Cu<sup>R</sup> (Teixeira et al., 2008; Hsiao et al., 2011), e isolados Cu<sup>R</sup> como Cu<sup>T</sup> (Gochez et al., 2018). Diferentemente da resistência, que pode ser determinada pela presença de genes específicos e crescimento bacteriano em altas concentrações de cobre, a tolerância é de difícil caracterização devido a inexistência de um indicador genético semelhante (Brauner et al., 2016) como este trabalho demonstrou.

Análises moleculares revelaram que as diferenças entre os fenótipos Cu<sup>S</sup>, Cu<sup>T</sup> e Cu<sup>R</sup> podem ser explicadas, ao menos parcialmente, pela presença ou ausência e expressão de genes específicos. Tanto isolados Cu<sup>T</sup> quanto Cu<sup>S</sup> não apresentaram os genes responsáveis pela resistência *copLAB* e *copABCD*, tampouco os plasmídeos grandes que normalmente portam estes genes. Estes agrupamentos gênicos são descritos como essenciais para conferir os fenótipos de resistência em diversas espécies de bactérias fitopatogênicas como *Pseudomonas syringae* pv. tomato, *X. euvesicatoria*, *X. perforans*, *X. gardneri* (Behlau et al., 2013; Cooksey et al., 1987), *X. axonopodis* pv. vesicatoria (Voloudakis et al., 1993; Voloudakis et al., 2005; Basim et al., 2005), *X. campestris* pv. juglandis (Lee et al., 1994; Behlau et al., 2013), *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* (Behlau et al., 2011) e *X. citri* (Behlau et al., 2011; Richard et al., 2017). Na maior parte destes casos, os genes de resistência codificam proteínas que possuem a função de ligação ao íon cobre. Este sistema sequestra o metal e o torna indisponível à bactéria (Voloudakis et al., 2005). Por isso, é comum que, quando isolados Cu<sup>R</sup> são cultivados em meio sólido contendo sulfato de cobre, as colônias tipicamente amarelas de *Xanthomonas* tornam-se azul-esverdeadas devido ao acúmulo de cobre (Silva Junior & Behlau, 2018). A

diferenciação de isolados Cu<sup>R</sup> dos Cu<sup>S</sup> e Cu<sup>T</sup> é relativamente simples. Além de testes de crescimento bacteriano em meio de cultura contendo concentrações elevadas de cobre, pode ser feita a análise de PCR. Neste caso, *primers* específicos são capazes de detectar os genes de resistência ao cobre dos agrupamentos gênicos caracterizados previamente *copLAB* (Behlau et al., 2013) e *copABCD* (Richard et al., 2017). No entanto, é possível que existam outros genes envolvidos com a resistência ao cobre que ainda não foram caracterizados para os quais a análise por PCR pode ser inconclusiva.

A característica de resistência ao cobre foi transferida de isolados Cu<sup>R</sup> para Cu<sup>S</sup>, como também observado por Behlau et al. (2012) e também para Cu<sup>T</sup>. No entanto, não foi observada a transmissão do fenótipo de tolerância a isolados Cu<sup>S</sup>. Provavelmente isso se deve ao fato do fenótipo da tolerância estar relacionado a genes basais conservados, não somente *cohLAB*, mas também a outros genes cromossomais (Fan et al., 2018). A transferência horizontal de genes responsáveis por características específicas, como a resistência a metais e antibióticos, é um processo comum entre as bactérias da mesma espécie ou até mesmo entre espécies diferentes. A transferência interespecífica de genes de resistência ao cobre presentes em plasmídeos grandes foi demonstrada por Behlau et al. (2012) mediante ensaio de conjugação entre *X. citri*, *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* e *X. perforans*, *X. citri* e *X. perforans*. Da mesma forma, Sidrim et al. (1998) comprovaram a conjugação de plasmídeos contendo genes de resistência à ampicilina de *Shigella flexneri* para *Escherichia coli*. Apesar do fenótipo de tolerância não ter sido transferido a isolados Cu<sup>S</sup>, o nível de resistência ao cobre de transconjugantes obtidos com os isolados receptores Cu<sup>T</sup> foi similar aquele dos isolados doadores Cu<sup>R</sup>. Por outro lado, o nível de resistência ao cobre de transconjugantes obtidos com os isolados receptores Cu<sup>S</sup> foi menor que o dos isolados doadores Cu<sup>R</sup>. Assim, é possível que outros genes, inexistentes em isolados Cu<sup>S</sup>, possam estar envolvidos na completa expressão dos genes *cop*, e que essa deficiência é suplementada nos transconjugantes com receptores Cu<sup>T</sup> pela maior expressão dos genes cromossomais *coh*.

Os genes homólogos aos de resistência, *cohLAB*, estão presentes no cromossomo dos fenótipos Cu<sup>S</sup>, Cu<sup>T</sup> e Cu<sup>R</sup>, e apresentaram 100% de similaridade entre suas sequências de nucleotídeos. Estes genes estão envolvidos no mecanismo de homeostase de cobre, o qual é responsável por manter concentrações ideais de cobre no meio intracelular e garantir as necessidades metabólicas essenciais da bactéria (Bender et al., 1990). Diferentemente dos genes *cop*, os genes *coh* são essenciais. Teixeira et al. (2008) demonstraram que a inativação do gene *cohA* tornou o isolado mutante incapaz de crescer em baixas concentrações de cobre. Outras bactérias do gênero *Xanthomonas* também apresentam genes *cohLAB*, incluindo *X.*

*campestris* pv. *vesicatoria*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* e *X. fuscans* subsp. *fuscans* (Behlau et al., 2011; Jalan et al., 2011; Jacobs et al., 2015). Mecanismos de homeostase foram relatados anteriormente em outras bactérias patogênicas como *Enterococcus faecium* (Hasman et al., 2005), *Bacillus subtilis* (Gaballa et al., 2003) e *Heliobacter pilori* (Waider et al., 2002), porém sob regulação de genes distintos. Em *Enterococcus hirae*, os genes de homeostase codificam ATPases responsáveis pelo transporte de cobre por meio do sistema de influxo e efluxo de íons da célula (Solioz & Odermatt, 1995; Wunderli-Ye & Solioz, 2001).

Todos os fenótipos, principalmente  $\text{Cu}^T$ , apresentaram aumento de expressão individual dos genes *cohL*, *cohA* e *cohB* quando expostos ao cobre. Portanto, é possível que a diferença de fenótipo entre isolados  $\text{Cu}^T$  e  $\text{Cu}^S$  esteja associada a maior expressão dos genes *coh*, especialmente, *cohA* e *cohB*, em isolados  $\text{Cu}^T$ . Além disso, como a sequência de nucleotídeos de *cohLAB* destes fenótipos é idêntica, a maior expressão destes genes pode estar associada a outros genes responsáveis pela regulação transcricional de *cohLAB* ou ainda à existência de outros genes que atuam diretamente na homeostase de cobre. Fan et al. (2018) observaram que em contato com cobre, isolados de *X. citri* apresentaram maior expressão do gene *XAC1347*, que codifica proteína de membrana externa, indicando um possível envolvimento deste gene na regulação de cobre na célula bacteriana.

Ao caracterizar de forma quantitativa a sensibilidade ao cobre de isolados de *X. citri*, foi possível identificar neste estudo isolados de *X. citri*  $\text{Cu}^T$  e compará-los geneticamente aos isolados  $\text{Cu}^S$  e  $\text{Cu}^R$ . Os resultados obtidos neste estudo indicam que os isolados  $\text{Cu}^T$  não são precursores de isolados  $\text{Cu}^R$ , os quais dependem da presença de genes específicos que conferem tal fenótipo, tampouco representam uma ameaça à sustentabilidade do uso de bactericidas à base de cobre para o manejo do cancro cítrico nos pomares. A correta identificação e diferenciação destes dois fenótipos é importante para o correto monitoramento da distribuição dos isolados  $\text{Cu}^R$  e adoção de medidas de contenção.

## 5. CONCLUSÃO

Isolados de *X. citri* Cu<sup>T</sup> suportam concentrações intermediárias de cobre em relação aos isolados Cu<sup>S</sup> e Cu<sup>R</sup>.

Isolados de *X. citri* Cu<sup>T</sup> diferem geneticamente dos isolados Cu<sup>R</sup> por não apresentarem os genes de resistência ao cobre e os plasmídeos grandes que normalmente portam estes genes.

Isolados de *X. citri* Cu<sup>T</sup> diferem geneticamente dos isolados Cu<sup>S</sup> pela maior expressão dos genes cromossomais *cohA* e *cohB* na presença de cobre.

## REFERÊNCIAS

- Argüello, J.M., Raimunda, D., Padilla-Benavides, T. 2013. Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** 3:1-14.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. 1995. **Current protocols in molecular biology**. New York: Wiley.
- Azevedo, J.L. 1963. Mutantes resistentes à antibióticos em *Xanthomonas campestris* (Fammel) Dowson. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**. Piracicaba. 20:149-162.
- Baptista, J.C., Machado, M.A., Homem, R.A., Torres, P.S., Vojnov, A.A., Amaral, A.M. 2010. Mutation in the *xpsD* gene of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri affects cellulose degradation and virulence. **Genetics and molecular biology** 33(1):146-153.
- Barbosa, J.C., Gimenes-Fernandes N., Massari, C.A., Ayres, J.C. 2001. Incidência e distribuição de cancro cítrico em pomares comerciais do Estado de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologia** 27:30-35.
- Basim, H., Minsavage, G.V., Stall, R.E., Wang, J.F., Shanker, S., Jones, J.B. 2005. Characterization of a unique chromosomal copper resistance gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. **Applied and Environmental Microbiology** 71:8284-8291.
- Behlau, F., Belasque Junior, J., Bergamin Filho, A., Graham, J.H., Leite Junior, R.P, Gottwald, T.R. 2008. Copper sprays and windbreaks for control of citrus canker on young orange trees in southern Brazil. **Crop Protection** 27:807-813.
- Behlau, F., Amorim, L., Belasque Junior, J., Bergamin Filho, A., Leite Junior., R.P., Graham, J.H., Gottwald, T.R. 2010. Annual and polyetic progression of citrus canker on trees protected with copper sprays. **Plant Pathology** 59:1031-1036.
- Behlau, F., Canteros, B.I., Minsavage, G.V., Jones, J.B., Graham, J.H. 2011. Molecular characterization of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfafeae* subsp. *citrumelonis*. **Applied and Environmental Microbiology** 77: 4089-4096.
- Behlau, F., Graham, J.H., Jones, J.B. 2012. Copper resistance genes from different xanthomonads and citrus epiphytic bacteria confer resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **European Journal of Plant Pathology** 133:949-963.
- Behlau, F., Hong, J.C., Jones, J.B., Graham, J.H. 2013. Evidence for acquisition of copper resistance genes from different sources in citrus-associated *Xanthomonas*. **Phytopathology** 103:409-418.
- Behlau, F., Belasque Junior, J. 2014. **Cancro cítrico: a doença e seu controle**. Araraquara, SP. Fundecitrus. 94 p.
- Behlau, F., Gochez, A.M., Lugo, A.J., Elibox, W., Minsavage, G.V., Potnis, N., White, F.F., Ebrahim, M., Jones, J.B., Ramsabhag, A. 2016. Characterization of a unique copper

resistance gene cluster in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolated in Trinidad, West Indies. **European Journal of Plant Pathology** 1-11.

Behlau, F., Scandelai, L.H.M., Silva Junior, G.J., Lanza, F.E. 2017. Soluble and insoluble copper formulations and metallic copper rate for control of citrus canker on sweet orange trees. **Crop Protection** 94:185-191.

Bender, C.L., Cooksey, D.A., 1986. Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: conjugative transfer and role in copper resistance. **Journal of Bacteriology** 165: 534-541.

Bender, C.L., Malvick, D.K., Conway, K.E., George, S., Cooksey, D.A. 1990. Characterization of pXv10A, a copper resistance plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Applied and Environmental Microbiology** 56:170-175.

Bergamin Filho, A., Amorin, L., Laranjeira, F.F., Gottwald, T.R. 2000. Epidemiology of citrus canker in Brazil with and without the Asian citrus leaf miner. **International Citrus Canker Research Workshop**. Fort Pierce, Division of Plant Industry, Florida Department of Agriculture and Consumer Services. 2000. p. 24-25.

Bitancourt, A.A. 1957. O cancro cítrico. **Biológico** 23:101-111.

Brasil. Instrução Normativa nº 21, de 25 de abril de 2018. Institui, em todo o território nacional, os critérios e procedimentos para o estabelecimento e manutenção do status fitossanitário relativo à praga denominada Cancro Cítrico (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) **Diário Oficial da União**. 11 de maio 2018. Seção 1. Disponível em: <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/instrucao-normativa-mapa-n-21-de-25-de-abril-de-2018,1152.html>>. Acesso em: 11 mai. 2018.

Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., Balaban, N.Q. 2016. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. **Nature Reviews Microbiology** 14:320-330.

Canteros, B.I. 1999. Copper resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. **Proceedings of the International Society of Bacteriology**. Chennai: Centre for Advanced Study in Botany, University of Madras. p. 455-459.

Canteros, B.I., Gochez, A.M., Moschini, R.C. 2017. Management of citrus canker in Argentina, a success story. **Plant Pathology** 33(5):441-449.

Chagas, M.C.M., Parra, J.R.P., Namekata, T., Hartung, J.S., Yamamoto, P.T. 2001. *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) and its relationship with the citrus canker bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Brazil. **Neotropical Entomology** 30(1):55-59.

Chillappagari, S., Seubert, A., Trip, H., Kuipers, O.P., Marahiel, M.A., Miethke, M. 2010. Copper stress affects iron homeostasis by destabilizing iron-sulfur cluster formation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology** 192:2512-2524.

- Cooksey, D.A. 1987. Characterization of a copper resistance plasmid conserved in copper resistant strains of *Pseudomonas syringae* pv. tomato. **Applied and Environmental Microbiology** 53:454-456.
- Cooksey, D.A. 1990. Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology** 28:201-219.
- Cooksey, D.A., Azad, H.R. 1992. Accumulation of copper and other metals by copper-resistant plant-pathogenic and saprophytic pseudomonads. **Applied and Environmental Microbiology** 58:274-278.
- Cooksey, D.A. 1993. Copper uptake and resistance in bacteria. **Molecular Microbiology** 7:1-5.
- Danós, E., Berger, R.D., Stall, R.E. 1984. Temporal and spatial spread of citrus canker within groves. **Phytopathology** 74(8):904-908.
- Fan, X., Guo, J., Zhou, Y., Zhuo, T., Hu, X., Zou, H. 2018. The ColRS-regulated membrane protein gene *XAC1347* is involved in copper homeostasis and *hrp* gene expression in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Frontiers in Microbiology** 9, 1171.
- FNP Consultoria e Comércio. 2016. **Agrianual 2016**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo. 456 p.
- Fundo de Defesa da Citricultura. 2018. **Estimativa da safra de laranja 2018/19 do cinturão citrícola de São Paulo e triângulo/sudoeste mineiro**. Araraquara: Fundecitrus. Disponível em:  
<[http://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes\\_relatorios/2018\\_09\\_05\\_Sum%C3%A1rio\\_Executivo\\_da\\_Estimativa\\_da\\_Safra\\_de\\_Laranja\\_2018-2019.pdf](http://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/2018_09_05_Sum%C3%A1rio_Executivo_da_Estimativa_da_Safra_de_Laranja_2018-2019.pdf)>. Acesso em: 09 mai. 2018.
- Gaballa, A., Cao, M., Helmann, J.D. 2003. Two MerR homologues that affect copper induction of the *Bacillus subtilis* *copZA* operon. **Microbiology** 149(12):3413-3421.
- Gimenes-Fernandes, N., Barbosa, J.C., Ayres, A.J., Massari, C.A. 2000. Plantas doentes não detectadas nas inspeções dificultam a erradicação do cancro cítrico. **Summa Phytopathologica** 26:320-325.
- Gochez, A.M., Huguet-Tapia, J.C., Minsavage, G.V., Shantaraj, D., Jalan, N., Strauß, A., Lahaye, T., Wang, N., Canteros, B.I., Jones, J.B., Potnis, N. 2018. Pacbio sequencing of copper-tolerant *Xanthomonas citri* reveals presence of a chimeric plasmid structure and provides insights into reassortment and shuffling of transcription activator-like effectors among *X. citri* strains. **BMC Genomics** 16-19.
- Gottwald, T.R., Graham, J.H., Egel, D.S. 1992. Analysis of foci of Asiatic citrus canker in a Florida citrus orchard. **Plant Disease** 76(4):389-396.
- Gottwald, T.R., Graham, J.H., Schubert, T.S. 1997. An epidemiological analysis of the spread of citrus canker in urban Miami, Florida, and synergistic interaction with the Asian citrus leaf miner. **Fruits** 52(6):383-390.

Gottwald, T.R., Hughes, G., Graham, J.H., Sun, X., Riley, T. 2001. The citrus canker epidemic in Florida: The scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species. **Phytopathology** 91(1):30-34.

Gottwald, T.R., Sun, X., Riley, T., Graham, J.H., Ferrandino, F., Taylor, E.L. 2002. Geo-referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida. **Phytopathology** 92(4):361-377.

Graham, J.H., Dewdney, M.M., Myers, M.E. 2010. Streptomycin and copper formulations for control of citrus canker on grapefruit. **Proceedings Florida State Horticultural Society**. 123:92-98.

Graham, J.H., Dewdney, M.M., Yonce, H.D. 2011. Comparison of copper formulations for control of citrus canker on 'Hamlin' Orange. **Proceedings Florida State Horticultural Society** 124:79-84.

Graham, J.H., Brooks, C., Yonce, H.D. 2016. Importance of early season copper sprays for protection of Hamlin orange fruit against citrus canker infection and premature fruit drop. **Proceedings Florida State Horticultural Society**. 129:74-78.

Hasman, H., Aarestrup, F.M. 2005. Relationship between copper, glycopeptides, and macrolide resistance among *Enterococcus faecium* strains isolated from pigs in Denmark between 1997 and 2003. **Antimicrobial Biochemistry** 49(1):454-456.

Hiniker, A., Collet, J.F., Bardwell, J.C. 2005. Copper stress causes an *in vivo* requirement for the *Escherichia coli* disulfide isomerase *DsbC*. **Journal of Biological Chemistry** 280(40): 33785-33791.

Hoshino, N., Kimura, T., Yamaji, A., Ando, T. 1999. Damage to the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by catechin copper complexes. **Free Radical Biology Medicine** 27:1245-1250.

Hsiao, Y., Liu, Y., Lee, P., Hsu, P., Tseng, S., Pan, Y. 2011. Functional characterization of *copA* gene encoding multicopper oxidase in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 59(17):9290-9302.

Jacobs, J.M., Pesce, C., Lefeuvre, P., Koebnik, R. 2015. Comparative genomics of a cannabis pathogen reveals insight into the evolution of pathogenicity in *Xanthomonas*. **Frontiers in Plant Science** 6:431.

Jalan, N., Aritua, V., Kumar, D., Yu, F., Jones, J.B., Graham, J.H., Setubal, J.C., Wang, N. 2011. Comparative genomic analysis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo* F1, which causes citrus bacterial spot disease, and related strains provides insights into virulence and host specificity. **Journal of Bacteriology** 193:6342-6357.

Jesus Junior, W.C., Belasque Junior, J., Amorim, L., Christiano, R.S.C., Parra, J.R.P., Bergamin Filho, A. 2006. Injuries caused by citrus leaf miner (*Phyllocnistis citrella*) exacerbate citrus canker (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) infection. **Fitopatologia Brasileira** 31(3):277-283.



- Kado, C.I., Liu, S.T. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. **Journal of Bacteriology** 145(3):1365-73.
- Lanza, F.E.E., Marti, W., Silva Junior, G.J., Behlau, F. 2018. Characteristics of citrus canker lesions associated with premature drop of Sweet orange fruit. **Phytopathology** doi: 10.1094.
- Lee, Y.A., Hendson, M., Panopoulos, N.J., Schroth, M.N. 1994. 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** 173-188.
- Leite Júnior, R.P. 1990. **Cancro cítrico: prevenção e controle no Paraná**. Londrina, PR: IAPAR. 51 p. Circular 61.
- Leite Júnior, R.P. 2000. Surviving with citrus canker in Brazil. **Proceedings of the International Society of Citriculture IX Congress 2000**. p. 890-896.
- Li, J., Wang, N. 2014. Foliar application of biofilm formation-inhibiting compounds enhances control of citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Phytopathology** 104(2):134-142.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. **Methods** 25:402-408.
- Macomber, L., Imlay, J.A. 2009. The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 106(20):8344-8349.
- Mellano, M.A., Cooksey, D.A. 1988. Nucleotide sequence and organization of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. tomato. **Journal of Bacteriology** 170: 2879-2883.
- Meneguim, L., Rinaldi, D.A.M.F., Santos, A.C.A., Rodrigues, S.L., Silva, M.R.L., Canteri, M.G., Leite Junior, R.P. 2007. Sensibilidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri ao cobre e mancozeb. **Fitopatologia brasileira** 32(3):247-252.
- Menkissoglu, O., Lindow, S.E. 1991. Chemical forms of copper on leaves in relation to the bactericidal activity of cupric hydroxide deposits on plants. **Phytopathology** 81:1263-1270.
- Meyer, D.F., Bogdanove, A.J. 2009 Genomics-driven advances in *Xanthomonas* biology. In: Jackson, R.W. (Ed.). **Plant pathogenic bacteria: genomics and molecular biology**. Norfolk, UK: Caister Academic Press. p. 147-1161.
- Minsavage, G.V., Canteros, B.I., Stall, R.E. 1990. Plasmid mediated resistance to streptomycin in *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. **Phytopathology** 80:719-723.
- Neves, M.F., Trombin, V.G., Milan, P., Lopes, F.F., Cressoni, F., Kalaki, R. 2010. **O Retrato da Citricultura Brasileira**. Ribeirão Preto: MARKESTRAT - Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia. 138 p.

Osman, D., Cavet, J.S. 2008. Copper homeostasis in bacteria. **Advances Applied Microbiology** 65:217-247.

Outten, F.W., Huffman, D.L., Hale, J.A., O'Halloran, T.V. 2001. The independent *cus* and *cue* systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry** 276(33):30670-30677.

Padmanabham, D., Vidhyasekaran, P., Rajagopalan, C.K.S. 1974. Changes in photosynthesis and carbohydrate content in canker and halo regions in *Xanthomonas* infected citrus leaves. **Indian Phytopathology** 26(2):215-217.

Richard, D., Ravigné, V., Rieux, A., Facon, B., Boyer, C., Boyer, K., Grygiel P., Javegny S., Terville M., Canteros B.I., Robène I., Vernière C., Chabirand A., Pruvost O., Lefeuvre P. 2017. Adaptation of genetically monomorphic bacteria: evolution of copper resistance through multiple horizontal gene transfers of complex and versatile mobile genetic elements. **Molecular Ecology** 26:2131-2149.

Sales Júnior, R., Oliveira, I.S., Mariano, R.L.R., Silva, G.F., Nunes, G.H.S. 2005. Efeito de kasugamicina e oxicleto de cobre no controle da mancha aquosa do meloeiro. **Fitopatologia Brasileira** 30:295-298.

Scapin, M.S., Behlau, F., Scandelai, L.H.M, Fernandes, R.S., Silva Junior, G.J., Ramos, H.H. 2015. Tree-row-volume-based sprays of copper bactericide for control of citrus canker. **Crop Protection** 77:119-126.

Sidrim, J.J.C., Moreira, J.L.B., Paixão, G.C., Lima, B., Filho, R.E.M., Rocha, M.F.G., Lima, A.A.M. 1998. Multirresistência a antimicrobianos mediada por plasmídios R em cepas de *Shigella flexneri* isoladas no nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 31:263-270.

Silva, A.C.R., Ferro, J.A., Reinach, F.C., Farah, C.S., Furlan, L.R., Quaggio, R.B., Monteiro-Vitorello, C.B., Van Sluys, M.A., Almeida, N.F., Alves, L.M.C., Do Amaral, A.M., Bertolini, M.C., Camargo, L.E.A., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Ciapina, L.P., Cicarelli, R.M.B., Coutinho, L.L., Cursino-Santos, J.R., El-Dorry, H., Faria, J.B., Ferreira, A.J.S., Ferreira, R.C.C., Ferro, M.I.T., Formighieri, E.F., Franco, M.C., Greggio, C.C., Gruber, A., Katsuyama, A.M., Kishi, L.T., Leite Junior, R.P., Lemos, E.G.M., Lemos, M.V.F., Locali, E.C., Machado, M.A., Madeira, A.M.B.N., Martinez-Rossi, N.M., Martins, E.C., Meidanis, J., Menck, C.F.M., Miyaki, C.Y., Moon, D.H., Moreira, L.M., Novo, M.T.M., Okura, V.K., Oliveira, M.C., Oliveira, V.R., Pereira JR., H.A., Rossi A., Sena, J.A.D., Silva, C., De Souza, R.F., Spinola, L.A.F., Takita, M.A., Tamura, R.E., Teixeira, E.C., Tezza, R.I.D., Trindade, M.S., Truffi, D., Tsai, S.M., White, F.F., Setúbal, J.C., Kitajima, J.P. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature** 417(6887):459-463.

Silva Junior, G.J., Behlau, F. 2018. Controle químico. In: Amorin, L., Resende, J., Bergamin Filho, A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 5.ed. São Paulo: Ceres, p. 239-260. v. 1.

Solioz, M., Odermatt, A. 1995. Copper and silver transport by *copB*-ATPase in membrane vesicles of *Enterococcus hirae*. **Journal of Biological Chemistry** 270:9217-9221.

Stall, R.E., Seymour, C.P. 1983. Canker, a threat to citrus in the gulf-coast states. **Plant Disease** 67(5):581-585.

Stall, R.E., Loschke, D.C., Jones, J.B. 1986. Linkage of copper resistance and avirulence loci on a self-transmissible plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. **Phytopathology** 76:240-243.

Stein, B., Ramalho, J., Foguet, L., Graham, J.H. 2007. Citrus leaf miner control and copper fungicides sprays for management of citrus canker on lemon in Tucuman, Argentina. **Proceedings Florida State Horticultural Society** 120:127-131.

Stein, B.E., Ramallo, C.J., Salas, H., Foguet, L., Graham, J.H. 2014. Evaluación de diferentes formulaciones cúpricas para el control de la cancrrosis de los cítricos en limoneros en la provincia de Tucumán, R. Argentina. **Revista industrial y agrícola de Tucumán** 91:9-16.

Sundin, G.W., Jones, A.L., Fulbright, D.W. 1989. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from cherry orchards and its associated transfer in vitro and in planta with a plasmid. **Phytopathology** 79:861-865.

Teixeira, E.C., Franco, J.C.O., Marques Novo, M.T., Bertolini, M.C. 2008. The copper resistance operon *copAB* from *Xanthomonas axonopodis* pv. citri: gene inactivation results in copper sensitivity. **Microbiology** 154(2):402-412.

Vandesompele, J.O., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology** 3(7):1-12.

Voloudakis, A.E., Bender, C.L., Cooksey, D.A. 1993. Similarity between copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* and *Pseudomonas syringae*. **Applied and Environmental Microbiology** 59:1627-1634.

Voloudakis, A.E., Reignier, T.M., Cooksey, D.A. 2005. Regulation of resistance to copper in *Xanthomonas axonopodis* pv. vesicatoria. **Applied and Environmental Microbiology** 71:782-789.

Waider, B., Melchers, K., Ivanov, I., Loferer, H., Bensch, K.W., Kist, M., Bereswill, S. 2002. Identification by RNA profiling and mutational analysis of the novel copper resistance determinants *CrdA* (HP1326), *CrdB* (HP1327), and *CzcB* (HP1328) in *Helicobacter pylori*. **Journal of Bacteriology** 187(13):4683-4688.

Wunderli-Ye, H., Solioz, M. 2001. Purification and functional analysis of the copper ATPase *copA* of *Enterococcus hirae*. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 280(3):713-719.