
Ciências Biológicas

Natália Alleoni

**PERFIL GENÉTICO E FENOTÍPICO DE
LINHAGENS XANTHOMONAS CITRI ISOLADAS
DE POMARES COM DIFERENTES INCIDÊNCIAS
DE CANCRO CÍTRICO**



Rio Claro - SP
2022

NATÁLIA ALLEONI

**PERFIL GENÉTICO E FENOTÍPICO DE LINHAGENS
XANTHOMONAS CITRI ISOLADAS DE POMARES COM
DIFERENTES INCIDÊNCIAS DE CANCRO CÍTRICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Bacharela em Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Henrique Ferreira

Coorientador: MSc. Caio Felipe Cavicchia Zamuner

Rio Claro - SP
2022

A433p Alleoni, Natalia
Perfil genético e fenotípico de linhagens Xanthomonas citri isoladas de pomares com diferentes incidências de cancro cítrico / Natalia Alleoni. -- Rio Claro, 2022
33 p. : il., tabs., fotos, mapas

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Henrique Ferreira
Coorientador: Caio Felipe Cavicchia Zamuner

1. Microorganismos fitopatogênicos. 2. Biologia molecular. 3. Cobre. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

NATÁLIA ALLEONI

**PERFIL GENÉTICO E FENOTÍPICO DE LINHAGENS
XANTHOMONAS CITRI ISOLADAS DE POMARES COM
DIFERENTES INCIDÊNCIAS DE CANCRO CÍTRICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências da Universidade Estadual
Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Câmpus de Rio
Claro, para obtenção do grau de Bacharela
Ciências Biológicas

BANCA EXAMINADORA:


Prof. Dr. Henrique Ferreira (orientador)


MSc. Caio Felipe Cavicchia Zamuner (coorientador)


Prof. Dr. Douglas Silva Domingues

Prof^(a). Dr^(a). Karen Cristiane Martinez de Moraes

Aprovado em: 19 de janeiro de 2022


Assinatura do discente


Assinatura do(a) orientador(a)


Assinatura do(a) coorientador(a)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro dado ao processo 2018/24953-0 e permitiu a realização deste presente trabalho.

Agradeço aos meus pais, Regina e Antenor, pelo apoio, pelos incentivos nos momentos difíceis e por acreditaram em mim.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Henrique Ferreira, pela oportunidade, por todo aprendizado compartilhado e pela paciência, contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço aos integrantes do Laboratório de Genética de Bactérias (LGB), Caio, Giovani, Guilherme, Hayen e Mario, pela convivência, pelos momentos de aprendizado e ajudas, e pelas risadas que tivemos no laboratório.

Agradeço aos meus amigos da graduação Alicia, Catarina, Juliana, Iryna, Lucas, Gustavo e Talita pelo apoio e convívio nos momentos bons e ruins.

Agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para o desenvolvimento deste trabalho.

Obrigado!

“The greatest scientific discovery was the discovery of ignorance. Once humans realised how little they knew about the world, they suddenly had a very good reason to seek new knowledge, which opened up the scientific road to progress.”

— Yuval Noah Harari

RESUMO

O Brasil é o maior produtor de laranjas doce do mundo, e a citricultura constitui uma das atividades agrícolas mais importantes para nosso país. A citricultura é ameaçada pelo cancro cítrico, uma doença infecciosa e sem cura, que acomete todas as variedades de citros de importância comercial. O agente etiológico desta doença é a bactéria Gram-negativa *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*), que se encontra presente e em caráter endêmico no estado de São Paulo, o maior produtor de laranjas doce do mundo. Este estado foi declarado área de mitigação de risco (SMR), com o uso de sprays regulares de formulações a base de cobre. Tais medidas, embora eficazes, são paliativas, pois a resistência ao cobre já foi documentada em *X. citri*, além do fato de ser este um metal bio-cumulativo e tóxico. Assim o objetivo foi verificar variações fenotípicas e/ou genotípicas em isolados de *X. citri* de áreas diferentes. Foram obtidos 390 isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e foram testadas 89 para susceptibilidade a cobre. Os isolados foram classificados em: 79 como sensíveis (Cu^{S}), 8 tolerantes (Cu^{T}) e 1 como mais tolerantes ($\text{Cu}^{\text{T}+}$); não foram obtidos isolados resistentes ao cobre. Com exceção dos controles, nenhuma das linhagens testadas apresentaram amplificação para os genes *copLAB* e *copABCD*, indicando ausência dos plasmídeos de resistência. Ainda, as linhagens foram testadas quanto a sua susceptibilidade aos antibióticos comerciais: ácido nalidíxico, canamicina, rifampicina e cloranfenicol. Estas não apresentaram crescimento nas concentrações de canamicina e rifampicina capazes de inibir a linhagem Cu^{S} *X. citri* 306 - usada como controle neste teste - porém, mostraram-se resistentes a cloranfenicol crescendo em todas as concentrações testadas. O ácido nalidíxico foi capaz de inibir o crescimento de todas as linhagens, com exceção a $\text{Cu}^{\text{T}+}$ CAJ 45 que apresentou crescimento na concentração mais baixa (7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Das linhagens testadas, apenas 3 (CAJ 28, CAJ 73 e AM 52) apresentaram alterações na motilidade, crescendo similarmente ao controle Cu^{S} *X. citri* 306, já os demais isolados apresentaram crescimento semelhante aos controles Cu^{R} , indicando que uma maior tolerância não altera a motilidade. No teste de biofilme apenas o isolado $\text{Cu}^{\text{T}+}$ CAJ 45 apresentou uma redução significativa na formação de biofilme, contrariando o esperado que uma linhagem mais tolerante produz mais biofilme.

Palavras-chaves: microorganismos fitopatogênicos; biologia molecular; cobre

ABSTRACT

Brazil is the largest sweet orange producer in the world, and citriculture represents an important economic activity in the country. The sector is threatened by citrus canker, an infectious and incurable disease that affects all commercially important citrus varieties. The causing agent of this disease is the Gram-negative bacteria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*), which is present and endemic in the state of São Paulo. São Paulo was declared an area of risk mitigation (SMR), with the use of regular sprays of copper formulations. Such measures, although effective, seem palliative, as copper resistance has already been documented in *X. citri*, in addition to the fact that this is a bio-accumulative and toxic metal. Thus, the objective was to verify phenotypic and/or genotypic variations in *X. citri* isolates from different areas. 390 isolates of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* were obtained and 89 were tested for their copper susceptibility. The isolates were then classified accordingly, as: 79 as sensitive (Cu^{S}), 8 tolerant (Cu^{T}) and 1 as more tolerant ($\text{Cu}^{\text{T}+}$), no isolates resistant to copper were obtained. With the exception of the positive controls, none of the isolates tested amplified bands for the genes *copLAB* and *copABCD*, remarking the absence of resistance plasmids. Furthermore, the isolates were tested for their susceptibility to commercial antibiotics: nalidixic acid, kanamycin, rifampicin and chloramphenicol. The isolates did not grow under concentrations of kanamycin and rifampicin capable of inhibiting the Cu^{S} *X. citri* 306 strain - used as a control in this test - however, they were resistant to chloramphenicol, growing on all tested concentrations. Nalidixic acid was able to inhibit the growth of all isolates, with the exception of $\text{Cu}^{\text{T}+}$ CAJ 45, which showed growth at the lowest concentration (7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Of the strains tested, only 3 (CAJ 28, CAJ 73 and AM 52) showed changes in motility, growing similarly to the Cu^{S} *X. citri* 306 control, while the other isolates showed similar growth to the Cu^{R} controls, indicating that a greater tolerance does not change motility. In the biofilm test, the isolate $\text{Cu}^{\text{T}+}$ CAJ 45 showed a significant reduction in biofilm formation, contrary to the expected that a more tolerant strain produces more biofilm.

Keywords: phytopathogenic microorganisms; molecular biology; copper

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	9
1.1	Incidência do cancro cítrico no estado de São Paulo.....	9
1.2	Cobre	10
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
2.1	Linhagens de <i>Xanthomonas citri</i> e cultivo	13
2.2	Susceptibilidade a cobre	13
2.3	Extração de DNA total.....	13
2.4	PCR diagnóstico	14
2.5	PCR para identificação da presença de genes de resistência a cobre	14
2.6	Ensaio de formação de biofilme	15
2.7	Teste de motilidade bacteriana em superfície.....	16
2.8	Susceptibilidade a antibióticos comerciais	16
3	RESULTADOS	17
3.1	Coletas	17
3.2	PCR diagnóstico	18
3.3	Susceptibilidade a cobre	19
3.4	PCR de genes de resistência a cobre	21
3.5	Formação de biofilme.....	25
3.6	Motilidade.....	26
3.7	Avaliação de destoxificação a antibióticos	27
4	DISCUSSÃO.....	28
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1. INTRODUÇÃO

1.1 Incidência do cancro cítrico no estado de São Paulo

O Brasil é o líder mundial na produção de laranja doce e a produção está entre as dez principais atividades agrícolas do país que gera centenas de milhares de postos de trabalho e tem enorme impacto social e econômico (NEVES *et al.*, 2010). Apesar de sua relevância, a citricultura brasileira enfrenta diversas ameaças e doenças como o cancro cítrico.

O Cancro Cítrico é uma doença infecciosa que afeta todas as variedades cítricas comercialmente importantes e é causado pela bactéria Gram-negativa *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) (GOTTWALD *et al.*, 2002). A bactéria *X. citri* é capaz de penetrar o tecido vegetal através de aberturas naturais, como os estômatos, e outros ferimentos e lesões na planta. O cancro cítrico ocorre de forma localizada, e é conhecido por causar lesões necróticas em folhas, frutas e caule. Uma alta proliferação bacteriana em uma árvore pode levar à queda prematura de frutos, das folhas e até a morte da planta. Os frutos infectados ficam inviáveis para o comércio e ficam limitados à produção de sucos (BEHLAU *et al.*, 2016).

A disseminação de *X. citri* no campo ocorre por ação combinada de vento e chuva e a infecção é agravada pela presença da larva minadora de citros (*Phyllocnistis citrella*), introduzida no Brasil em 1996, gerando um aumento nas ocorrências da doença (BERGAMIN FILHO *et al.*, 2000). A larva não age como vetor para o cancro, porém ela consome o mesófilo foliar, formando galerias e ferimentos que facilitam a entrada e propagação da bactéria na folha (CHAGAS *et al.*, 2001).

Hoje no campo, o controle ocorre através da eliminação das árvores infectadas e a utilização de compostos à base de cobre. No entanto, a identificação de focos de doenças para eliminação de árvores infectadas necessita de um alto número de inspetores (FERENCE *et al.*, 2018) e juntamente ao uso massivo de biocidas de cobre a resistência já surgiu e está se espalhando (BEHLAU *et al.*, 2013; CANTEROS, 1999).

A partir de 2010, após pressões de diversos setores, as políticas de controle do cancro cítrico no estado de São Paulo começaram a ser abrandadas e os procedimentos no campo passaram a ser cada vez menos supressivos, permitindo a ocorrência do cenário atual de endemismo. A ocorrência da doença que antes era

mantida baixa nos pomares até 2009 subiu significativamente, e chegou a atingir valores superiores a 60% em algumas áreas do noroeste do estado de São Paulo (FUNDECITRUS, 2018) (Figura 1).



Figura 1 Incidência do Cancro Cítrico em São Paulo. Fonte FUNDECITRUS, dados da pesquisa de 2017.

Em 25 de abril de 2018, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), publicou uma nova legislação para regulamentar o controle do cancro cítrico no país, e esta determina através da Instrução Normativa nº 21, quatro cenários possíveis: i) Área sem ocorrência de doença; ii) Área Livre da Praga; iii) Área sob Erradicação ou Supressão e; iv) Área sob Sistema de Mitigação de Risco (SMR). O estado de São Paulo ficou adotado o controle por SMR, permitindo que árvores infectadas permaneçam nos pomares. Agora os produtores podem fazer o manejo da doença pelo plantio de cultivares de citros menos suscetíveis ao cancro cítrico, instalação de barreiras (quebra-vento) para minimizar a dispersão da bactéria, controle da larva minadora dos citros e uso frequente de sprays com formulações de cobre (FERENCE *et al.*, 2018).

1.2 Cobre

No metabolismo de procariontos e eucariontos, o cobre é considerado um dos elementos essenciais pois atua como cofator de proteínas e enzimas participantes da respiração, proteínas do transporte de elétrons, oxigenases e ATPases. Entretanto, em altas concentrações, o cobre se torna citotóxico danificando membranas lipídicas e DNA, pois leva a produção de radicais livres (CHILLAPPAGARI *et al.*, 2010;

HINIKER; COLLET; BARDWELL, 2005)

Formulações em spray contendo cobre são os únicos bactericidas usados atualmente no controle da disseminação cancro cítrico, a fim de que possam ser eficazes, os sprays devem ser aplicados frequentemente no campo. O uso contínuo gera preocupações pois o cobre pode ser bio-cumulativo e é um metal tóxico para o meio ambiente (BRUNETTO *et al.*, 2016; CORNU *et al.*, 2017), além disso, gera uma pressão seletiva que impulsiona a seleção de bactérias resistentes e pode favorecer um aumento da frequência de patógenos resistentes dentro da população bacteriana, o que compromete a eficácia dos sprays a longo prazo (SUNDIN *et al.*, 1989), e ainda espera-se um acúmulo deste metal no ambiente.

Na década de 90, isolados resistentes ao cobre (Cu^R) de *X. citri* foram detectados na Argentina (CANTEROS, 1999). A caracterização genética dos isolados apontou que a resistência a cobre ocorre pela presença do agrupamento de genes plasmidiais *copLAB*, que também estão presentes em cepas Cu^R de *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* e várias outras espécies de *Xanthomonas* (BEHLAU *et al.*, 2011; BEHLAU *et al.*, 2013), e também ao agrupamento plasmidial *copABCD* (RICHARD *et al.*, 2017), previamente descrito em *X. arboricola* pv. *juglandis* Cu^R (LEE *et al.*, 1994) e *Pseudomonas syringae* (COOKSEY, 1990).

Mais recentemente, linhagens de *Xanthomonas* tolerantes ao cobre (Cu^T) foram descritas pela primeira vez. Estas linhagens podem crescer em concentrações intermediárias de sulfato de cobre (150 a 200 mg/L) e podem ser distinguidas das linhagens Cu^R pela falta de genes de resistência ao cobre presentes em plasmídeos. Além disso, as linhagens Cu^T diferiram dos isolados Cu^S pela maior expressão de genes cromossômicos de homeostase *cohLAB* (MARIN *et al.*, 2019). A correta identificação e diferenciação destes dois fenótipos é importante para um eficiente monitoramento da distribuição dos isolados Cu^R e a adoção de medidas apropriadas de contenção.

Havendo resistência a cobre, foi verificado se há presença de marcadores genéticos para tal característica (MARIN *et al.*, 2019). No caso de isolados classificados como tolerantes ao cobre, os mesmos foram investigados para analisar se possuem maior capacidade para detoxificar antibióticos comerciais, visto que a tolerância pode estar relacionada à maior atividade de bombas de efluxo. O perfil de virulência também foi avaliado, baseado em motilidade e capacidade de formar biofilme (*in vitro*), pois tais características já foram atribuídas à capacidade de infecção

do hospedeiro citros (MALAMUD *et al.*, 2012; MALAMUD *et al.*, 2011; RIGANO *et al.*, 2007).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Linhagens de *Xanthomonas citri* e cultivo

As linhagens para estudo foram coletadas em seis diferentes localidades do cinturão citrícola no estado de São Paulo. Como controles foram utilizadas as linhagens Cu^S de *X. citri* 306 IBSBF-1594, sequenciada (DA SILVA *et al.*, 2002), A44 e LM199 (Cu^R; cedidas pelo Fundecitrus). Linhagens foram cultivadas em meio NYG/NYG-ágar (peptona 5 g/L, extrato de levedura 3 g/L e glicerol 20 g/L; ágar 15g/L quando necessário) a 29 °C.

2.2 Susceptibilidade a cobre

O nível de sensibilidade ao cobre dos isolados foi analisado em comparação com as linhagens padrões Cu^S *X. citri* 306 e Cu^R A44 e LM199 (BEHLAU *et al.*, 2011). Afim de induzir a expressão de possíveis genes de resistência/tolerância os isolados foram cultivados em meio NYG+Cu, suplementado com uma concentração não inibitória de sulfato de cobre penta-hidratado (20 mg/L) a 29 °C, agitação de 200 rpm, durante 16 horas (BASIM *et al.*, 2005, com modificações). Após este período, a DO_{600nm} de cada cultivo foi ajustada para 0,3 de modo a se obter uma suspensão bacteriana de 10⁸ UFC/mL e 10 µL de cada suspensão foi transferida para placas com meio NYG ágar suplementado com diferentes concentrações de sulfato de cobre penta-hidratado (25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 mg/L) (adaptado de BEHLAU *et al.*, 2012). As placas foram incubadas a 29 °C durante 96 horas e avaliadas quanto a formação de colônias. Os isolados foram classificados como Cu^S, Cu^T ou Cu^R quando houver crescimento bacteriano nas concentrações ≤125, >150 a <200 e ≥ 500 mg sulfato de cobre penta-hidratado mg/L, respectivamente (MARIN *et al.*, 2019).

2.3 Extração de DNA total

Aproximadamente 10 miligramas de massa celular foi dissolvida em tampão de lise (Tris HCl, pH 8 10 mM; EDTA 1mM; Proteinase K 50 µg/mL), seguindo o tratamento, as amostras foram incubadas a 55 °C durante 15 minutos. Na sequência, amostras foram mantidas a 80 °C por 15 minutos para inativação da enzima

Proteinase K.

2.4 PCR diagnóstico

A reação de PCR para diagnóstico das linhagens de *X. citri* foi realizada com os *primers* *Xac1* (5'-CGCCATCCCCACCACCACGAC) e *Xac2* (5'-AACCGCTCAATGCCATCCACTTCA) para amplificação do fragmento diagnóstico de 581 pb (COLETTA-FILHO *et al.*, 2006). Reação: 0,5 U de *Taq* DNA polimerase, 0,5 α M de cada *primer*, 100 α M dNTPs, 1,5 mM MgCl₂ e tampão da enzima conforme recomendações do fabricante (Fermentas/Thermo Scientific). O ciclo de PCR consistiu em: desnaturação inicial a 92 °C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 92 °C / 30 segundos, 60 °C / 30 segundos e 72 °C / 30 segundos. Os produtos da reação foram analisados em gel de eletroforese quanto ao tamanho do fragmento. Como controle positivo foi utilizada a linhagem de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306, com genoma sequenciado por (DA SILVA *et al.*, 2002). As reações foram realizadas em termociclador T100 Thermal Cycler (BIO-RAD).

2.5 PCR para identificação da presença de genes de resistência a cobre

A reação de PCR para diagnóstico das linhagens de *X. citri* foi realizada com os *primers* do agrupamento gênico *copLAB* (BEHLAU *et al.*, 2013). Como controle positivo foi utilizada o isolado A44, que possui o agrupamento gênico *copLAB* em um plasmídeo que confere resistência ao cobre. Os tamanhos esperados dos fragmentos amplificados para linhagens com tal agrupamento gênico é de 360 pb para *copL*, 870 pb para *copA* e 535 pb para *copB*. O PCR para os genes *copLAB* tiveram o volume total de 25 μ L e foram utilizados 10 ng de DNA genômico molde, 1 U (unidade) de *Taq* DNA polimerase, tampão da enzima 1X, 0,2 mM de dNTPs, e 0,2 μ M de cada *primer*. O programa utilizado para as amplificações foi 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). Já o PCR para o agrupamento gênico de resistência *copABCD* tem como tamanho esperado para as amplificações de 171 pb para *copA*, 225 pb para *copB*, 300 pb para *copC* e 282 pb para *copD*. A reação foi realizada utilizando 50ng de DNA genômico, tampão da enzima 1X, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 μ M de cada *primer*, 3% de

DMSO (dimetilsulfóxido) e 1 U (unidade) de Taq DNA polimerase. O programa utilizado para as amplificações foi 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 da reação foram analisados em gel de agarose quanto ao tamanho dos fragmentos. Como controles negativos foram utilizadas as linhagens de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 (Cu^S), bem como o isolado Cu^R LM199. No caso do isolado LM199, o grupamento gênico plasmidial envolvido na resistência ao cobre é conferido à *copABCD* e não o *copLAB* conferido pela A44 (RICHARD *et al.*, 2017).

2.6 Ensaio de formação de biofilme

Para avaliar possíveis diferenças fenotípicas na formação de biofilme, as linhagens selecionadas foram avaliadas através do teste descrito por YAN; HU e WANG (2012), com modificações. Para tanto, as linhagens foram cultivadas em meio mínimo ((NH₄)₂SO₄ 5 g/L; KH₂PO₄ 22,5 g/L KH₂PO₄; Na₃C₆H₅O₇.2H₂O 2,5 g/L; MgSO₄.7H₂O 1 mM; Casaminoácidos 150 mg/L; Glicose 1%; pH 5,4) por 16 horas a 29 °C e 200 rpm em *shaker* Innova (modelo 4230). Cada cultivo teve sua DO_{600nm} ajustada para 0,3 e 7 mL foram coletados e centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado ressuscitado em 7 mL de meio mínimo. Um mL de cada cultura foi transferido para microplacas de 24 poços que foram incubadas em BOD a 29 °C durante 96 horas. Seguido o período de incubação em placa, o meio foi descartado e foram adicionados aos poços 1,5 mL de corante cristal violeta 0,1% por 1 hora, em temperatura ambiente. Após este período o corante foi descartado e os poços lavados com água Mili-Q. Seguido da lavagem do cristal violeta, foi adicionado 1 mL de DMSO e a microplaca foi incubada sob agitação de 300 rpm durante 16 horas. A leitura da absorbância (595 nm) foi medida em leitor de placas BioTek Sinergy (modelo H1) e os dados foram analisados através de ANOVA/Tukey. Os testes foram realizados em triplicatas com as linhagens A44 e LM199 como controles positivos e a linhagem 306 como controle negativo.

2.7 Teste de motilidade bacteriana em superfície

Para comparar diferenças fenotípicas relacionadas à motilidade celular, as linhagens foram avaliadas pelo teste descrito por MALAMUD *et al.* (2011), com modificações. Foram realizados cultivos das linhagens em meio NYG líquido incubados a 29 °C, 200 rpm de agitação, durante 16 horas em *shaker* Innova (modelo 4230). Após este período, a DO_{600nm} de cada cultura foi ajustada para 0,3. Cada cultura foi inoculada em placas com meio NYG semi-sólido 0,65% (5 g/L de peptona; 3 g/L de extrato de levedura; 20 mL/L de glicerol e 6.5 g/L de ágar), e mantidas em incubadora BOD (Ethik, modelo 411D) a 29 °C. O crescimento bacteriano foi avaliado após 72 horas, o halo de crescimento foi medido e os dados analisados através de ANOVA/Tukey. Os testes foram realizados em triplicatas com três repetições cada, tendo as linhagens A44 e LM199 como controles positivo e a linhagem 306 como controle negativo.

2.8 Susceptibilidade a antibióticos comerciais

O nível de sensibilidade a antibióticos dos isolados foi analisado em comparação com as linhagens padrões Cu^S *X. citri* 306 e Cu^R A44 e LM199. A fim de testar se as linhagens resistentes e tolerantes possuíam o mesmo mecanismo de detoxificação de cobre e de antibióticos comerciais, de ação conhecida. Para tanto, isolados selecionados foram cultivados em meio NYG a 29 °C, agitação de 200 rpm, durante 16 horas. Após este período, a DO_{600nm} de cada cultivo foi ajustada para 0,3 de modo a se obter uma suspensão bacteriana de 10⁷ UFC/mL e 10 µL de cada suspensão foi transferidos para placas com meio NYG-ágar suplementado com quatro antibióticos diferentes em três concentrações cada, sendo estas sua concentração inibitória, metade e um quarto, das definidas previamente em laboratório como inibitórias da linhagem Cu^S *X. citri* 306. Os antibióticos utilizados e suas respectivas concentrações foram o ácido nalidíxico (30 µg/mL, 15 µg/mL, 7,5 µg/mL), canamicina (20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL), rifampicina (150 µg/mL, 75 µg/mL, 37.5 µg/mL) e cloranfenicol (12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL, 3 µg/mL). As placas foram incubadas a 29 °C durante 96 horas e avaliadas quanto a formação de colônias. Os isolados foram classificados como resistentes ou tolerantes ao antibiótico.

3 RESULTADOS

3.1 Coletas

Foram feitas coletas de folhas de pomares de citros, com sintomas de cancro cítrico de diferentes regiões do cinturão citrícola do estado de São Paulo, no total foram obtidas 390 linhagens. Os pomares amostrados estão localizados em municípios da região norte (Marapoama e Cajobi), nordeste (Nova Aliança e Américo de Campos), centro (Itápolis) e sudeste (Pratânia) (Figura 1).

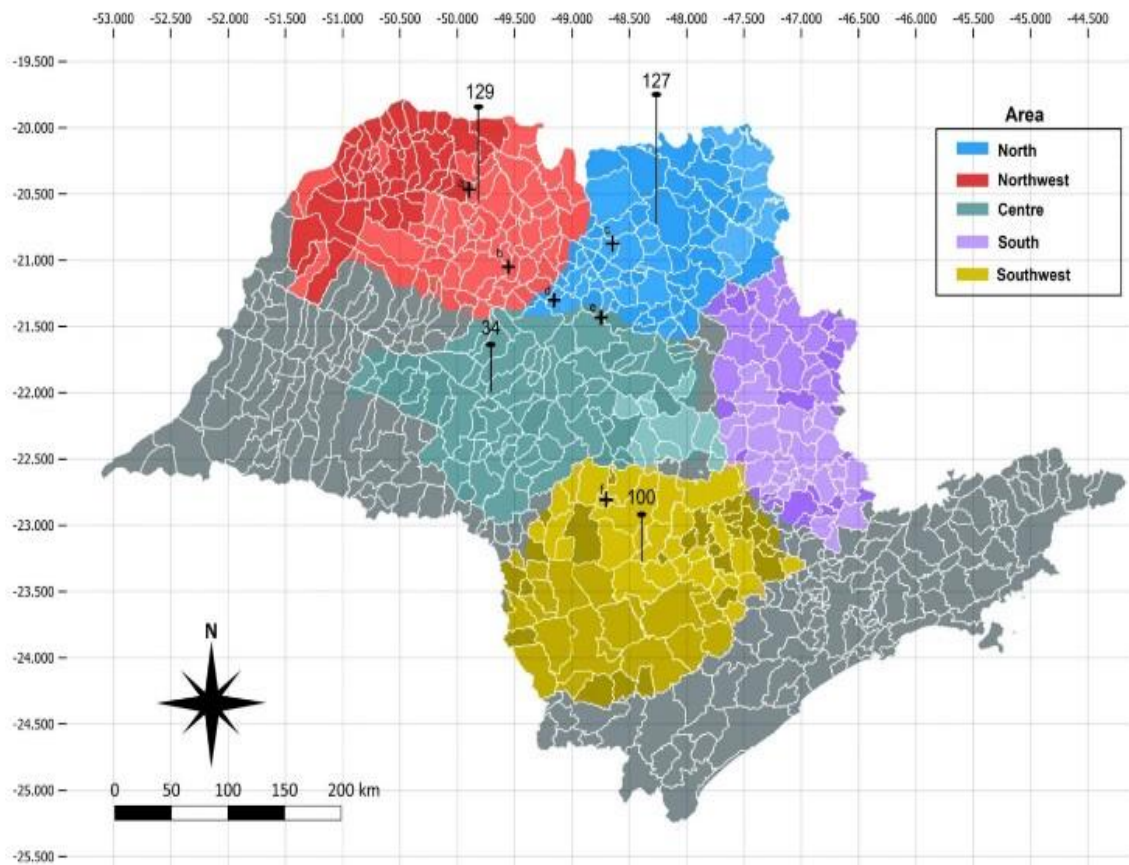


Figura 1 – Mapa do estado de São Paulo com as regiões de coleta destacadas. As letras representam a cidade de coleta dos isolados: (a) Américo dos Campos (Votuporanga); (b) Nova Aliança (São José do Rio Preto); (c) Cajobi (Bebedouro); (d) Marapoama (Bebedouro); (e) Itápolis (Matão) e (f) Pratânia (Avaré). Os valores em destaques representam o total de linhagens diagnosticadas e as letras indicam: Em vermelho, região nordeste com 129 linhagens diagnosticadas; em azul, região norte com 127 isolados, em verde, região central com 34 isolados e em amarelo a região sudoeste com 100 isolados. O mapa foi elaborado com auxílio do *software* QGIS v. 3.4.

3.2 PCR diagnóstico

Foram isoladas 430 bactérias, a partir das folhas coletadas, e estes foram submetidos a reação de PCR diagnóstico de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Após as reações, 390 linhagens apresentaram amplificação do fragmento diagnóstico de 581 pb e foram confirmadas como sendo *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Figura 2).

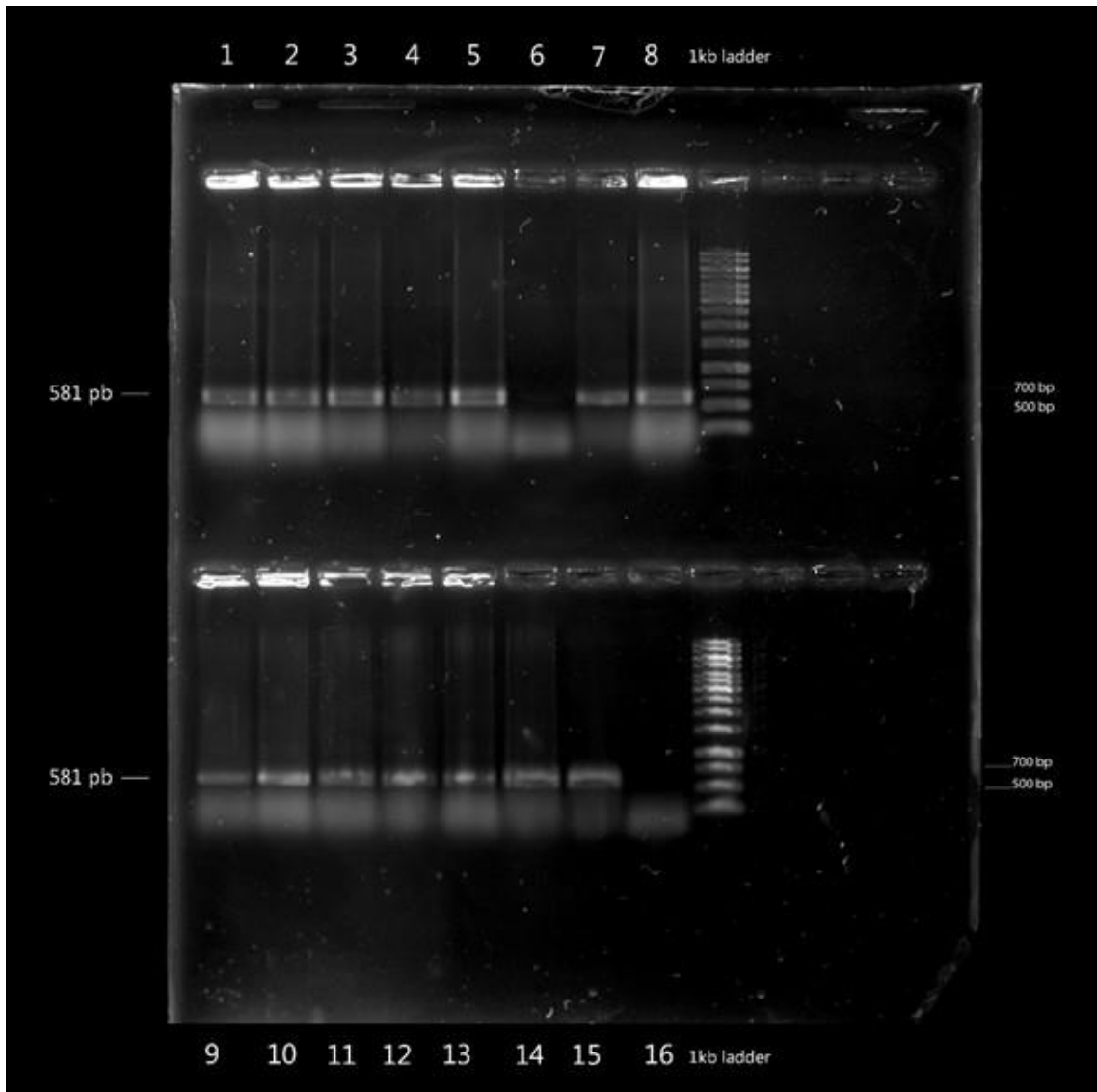


Figura 2 – Gel de agarose representativo do diagnóstico via PCR de isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* utilizando primers *Xac1* e *Xac2* para amplificação do fragmento diagnóstico de 581 pb (número à esquerda). Poços: 1 (AM 33); 2 (AM 34); 3 (AM 35); 4 (AM 36); 5 (AM 37); 6 (AM 38); 7 (AM 40); 8 (AM 41); 9 (AM 42); 10 (AM 44); 11 (AM 46); 12 (AM 47); 13 (AM 48); 14 (306); 15 (DNA 306); 16 (branco). (1kb GeneRuler Ladder).

3.3 Susceptibilidade a cobre

Os isolados foram classificados como sensíveis (Cu^{S}), tolerantes (Cu^{T}) e resistentes (Cu^{R}). Os controles positivos Cu^{R} (A44 e LM199), cresceram de 400 até 500 mg de cobre/L, e o controle sensível Cu^{S} (306) cresceu até 100 mg de cobre/L. Os demais isolados foram classificados de sensíveis os que cresceram até 125 mg/L, as tolerantes cresceram entre 150 a 200 mg/L e o resistente até 400 mg/L, nas placas de meio NYG suplementado com concentrações de sulfato de cobre pentahidratado. Da região norte foram obtidos 127 isolados e testados 32, da região nordeste foram obtidos 129 e testados 57 e da região central obtidos 34, totalizando 89 isolados testados (Tabela 1).

Tabela 1 - Relação dos 89 isolados selecionados e confirmados como *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e a região de onde foi realizada sua coleta

Região	Cidade	Linhagens selecionadas	Quantidade
	Marapoama	MAP 46, MAP 05	2
Norte	Cajobi	CAJ 2, CAJ 11, CAJ 14, CAJ 16, CAJ 25, CAJ 27, CAJ 31, CAJ 37, CAJ 39, CAJ 41, CAJ 42, CAJ 45, CAJ 51, CAJ 56, CAJ 57, CAJ 58, CAJ 59, CAJ 60, CAJ 61, CAJ 70, CAJ 76, CAJ 78, CAJ 79, CAJ 80, CAJ 13, CAJ 36, CAJ 28, CAJ 71, CAJ 72, CAJ 73	30
Nordeste	Américo de Campos	AM 2, AM 4, AM 6, AM 7, AM 8, AM 9, AM 10, AM 11, AM 13, AM 14, AM 16, AM 17, AM 19, AM 22, AM 23, AM 24, AM 25, AM 26, AM 28, AM 29, AM 30, AM 31, AM 33, AM 34, AM 35, AM 37, AM 40, AM 41, AM 42, AM 44, AM 46, AM 47, AM 48, AM 51, AM 53, AM 54, AM 55, AM 56, AM 57, AM 59, AM 60, AM 61, AM 62, AM 65, AM 66, AM 67, AM 68, AM 72, AM 74, AM 75, AM 76, AM 77, AM 78, AM 49, AM 52	55
	Nova Aliança	NA ₁ 35, NA ₂ 35	2

Das 89 linhagens escolhidas *Xanthomonas citri* subsp. *citri* estas foram classificadas quanto a faixa de crescimento apresentada no meio suplementado com cobre. Destes, 79 foram classificadas como sensível ao cobre (Cu^S), 8 foram classificadas como tolerantes (Cu^T), 1 foi classificado como mais tolerante (Cu^{T+}), por conta de seu crescimento intermitente e ausência de genes para os plasmídeos de resistência. Não foram encontrados isolados classificados como resistentes (Cu^R) (Tabela 2).

Tabela 2 - Classificação dos isolados selecionados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* de acordo com o crescimento em meio de cultura sólido NYG suplementado com diferentes concentrações de sulfato de cobre pentahidratado.

Classificação	Isolado	Quantidade
SUSCETÍVEL Cu ^S	MAP46	1
	CAJ 2, CAJ 11, CAJ 14, CAJ 16, CAJ 25, CAJ 27, CAJ 31, CAJ 37, CAJ 39, CAJ 41, CAJ 42 CAJ 51, CAJ 56, CAJ 57, CAJ 58, CAJ 59, CAJ 60, CAJ 61, CAJ 70, CAJ 76, CAJ 78, CAJ 79, CAJ 80	23
	AM 2, AM 4, AM 6, AM 7, AM 8, AM 9, AM 10, AM 11, AM 13, AM 14, AM 16, AM 17, AM 19, AM 22, AM 23, AM 24, AM 25, AM 26, AM 28, AM 29, AM 30, AM 31, AM 33, AM 34, AM 35, AM 37, AM 40, AM 41, AM 42, AM 44, AM 46, AM 47, AM 48, AM 51, AM 53, AM 54, AM 55, AM 56, AM 57, AM 59, AM 60, AM 61, AM 62, AM 65, AM 66, AM 67, AM 68, AM 72, AM 74, AM 75, AM 76, AM 77, AM 78, AM 49	54
TOLERANTE Cu ^T	NA ₁ 35, NA ₂ 35	2
	MAP 05	1
	CAJ 13, CAJ3 6, CAJ 28, CAJ 71, CAJ 72, CAJ 73	6
	AM 52	1
Cu ^{T+}	CAJ 45	1

3.4 PCR de genes de resistência a cobre

Os isolados classificados como Cu^{T+} e Cu^T foram submetidos à análise de PCR para o agrupamento gênico *copLAB* (BEHLAU *et al.*, 2013) e *copABCD* (RICHARD *et al.*, 2017) para se verificar a real presença de elementos móveis característicos do

grupo. Na sequência, realizamos os PCRs para detecção de genes do agrupamento gênico *copLAB*. Apenas o isolado controle A44 (canaleta 2) apresentou a banda relativa aos genes em questão. Os demais isolados $\text{Cu}^{\text{T}+}$ e Cu^{T} foram divididos em dois *pools* de DNA, o *pool* 1 possui os DNAs das linhagens MAP 05, CAJ 13, CAJ 28 e CAJ 36 e o *pool* 2 possui os DNAs das linhagens CAJ 71, CAJ 72, CAJ 73 e AM 52. Nota-se que a linhagem sensível 306, utilizada como controle negativo (canaleta 1), a linhagem LM199 (canaleta 3), não apresentaram as bandas, bem como os demais isolados (Figura 3).

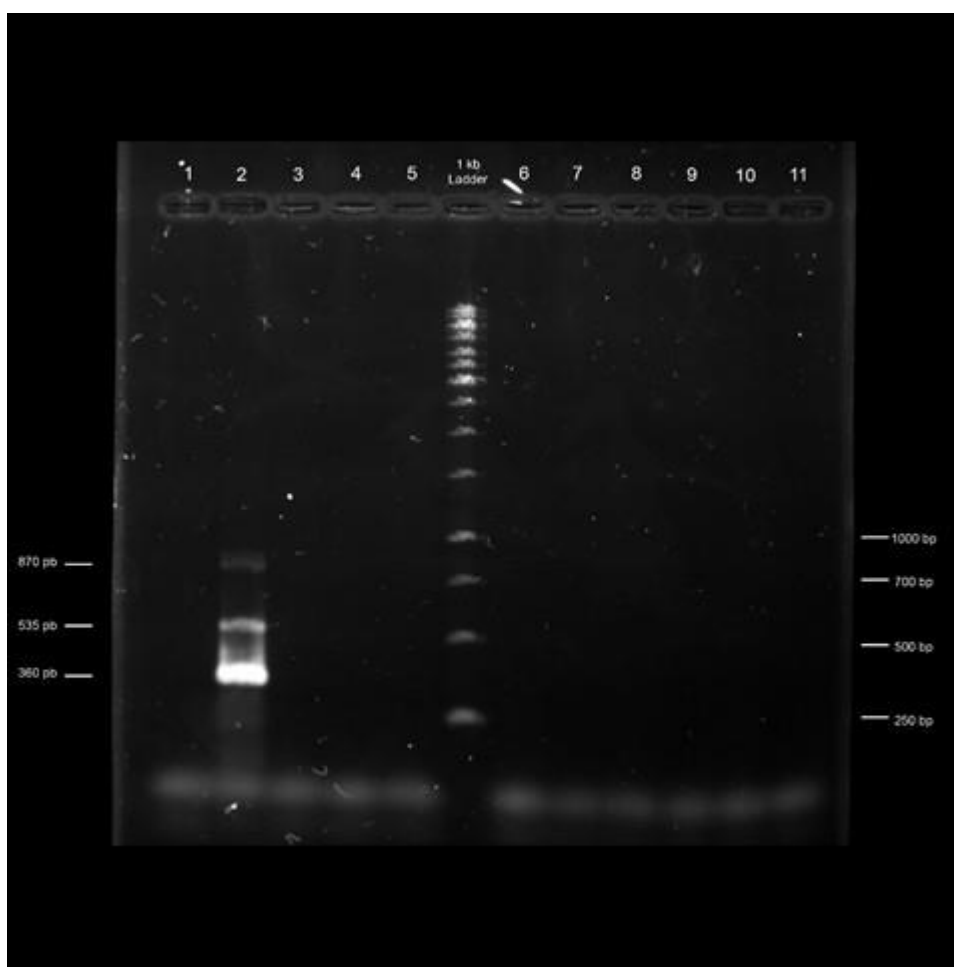


Figura 3 - PCR diagnóstico para genes *copLAB*. DNAs das linhagens selecionadas de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* foram utilizados como moldes em PCR juntamente com *primers* específicos para os genes que compõem o agrupamento gênico *copLAB*. Poços: 1 (306); 2 (A44); 3 (LM199); 4 (CAJ 45); 5 (*pool* 1 para gene *copL*); 6 (*pool* 2 para gene *copL*); 7 (*pool* 1 para gene *copA*); 8 (*pool* 2 para gene *copA*); 9 (*pool* 1 para gene *copB*); 10 (*pool* 2 para gene *copB*) e 11 (branco). (1kb GeneRuler Ladder).

Após, foram realizados PCRs para detecção de genes do agrupamento gênico *copABCD*. Primeiramente foi realizado um PCR multiplex utilizando os 4 genes juntos,

porém houveram ampliações de bandas inespecíficas para todos os isolados. Para evitar tal problema, os PCRs foram subsequentemente realizados de forma separada com *primers* para os genes *copA* e *copD*. O gene *copD* e seus respectivos *primers* foram utilizados como molde para a reação e os demais isolados $\text{Cu}^{\text{T}+}$ e Cu^{T} foram divididos em três *pools* de DNA: o *pool 1* possui os DNAs das linhagens MAP 05, CAJ 13 e CAJ 28, o *pool 2* os DNAs de CAJ 36, CAJ 71 e CAJ 72, e o *pool 3* possui os DNAs de CAJ 73 e AM 52.

Os controles negativos Cu^{S} *X. citri* 306 e A44 (canaleta 1 e 2 respectivamente), a linhagem mais tolerante $\text{Cu}^{\text{T}+}$ CAJ 45 (canaleta 3), e as demais linhagens Cu^{T} testadas não apresentaram a banda específica de 282 pb, apenas o controle Cu^{R} LM199 (canaleta 7) apresentou amplificação (Figura 4).

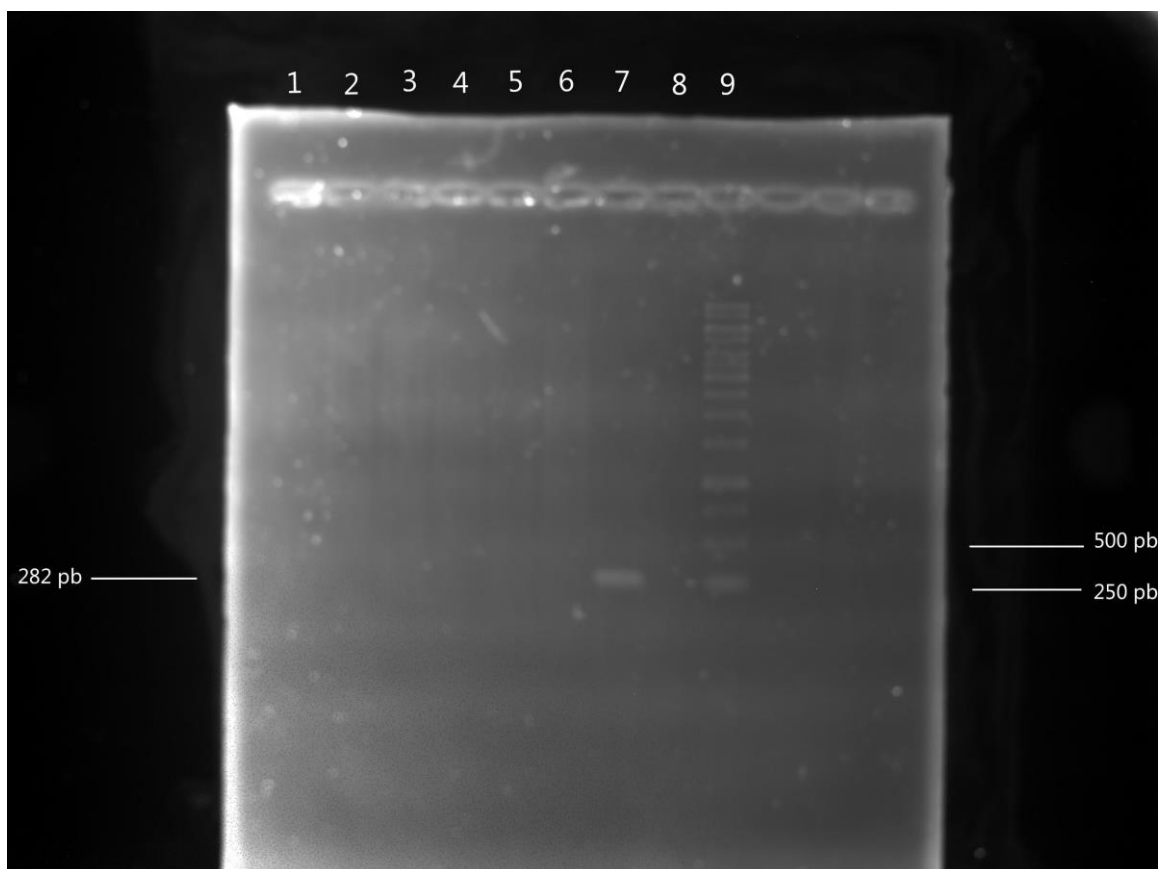


Figura 4 - PCR diagnóstico para o gene *copD* do agrupamento *copABCD*. DNAs das linhagens selecionadas de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* foram utilizados como moldes em PCR juntamente com *primer*, apenas o controle LM199 apresentou banda. Poços: 1 (306); 2 (A44); 3 (CAJ 45); 4 (*pool 1*); 5 (*pool 2*); 6 (*pool 3*); 7 (LM199); 8 (branco); 9 (1kb GeneRuler Ladder).

Para o PCR do gene *copA* do agrupamento *copABCD*, os DNAs foram divididos em dois *pools*: o *pool 1* contendo os DNAs das linhagens MAP 05, CAJ 13, CAJ 28 e CAJ 36 e o *pool 2* contendo os DNAs das linhagens CAJ 71, CAJ 72, CAJ 73 e AM 52. Apenas o controle positivo Cu^R LM199 (canaleta 2) apresentou amplificação esperada de 171 pb; controles negativos Cu^S *X. citri* 306 e A44 (canaleta 1 e 3 respectivamente), a linhagem mais tolerante Cu^{T+} CAJ 45 (canaleta 3) e as demais linhagens testadas não apresentaram banda (Figura 5).

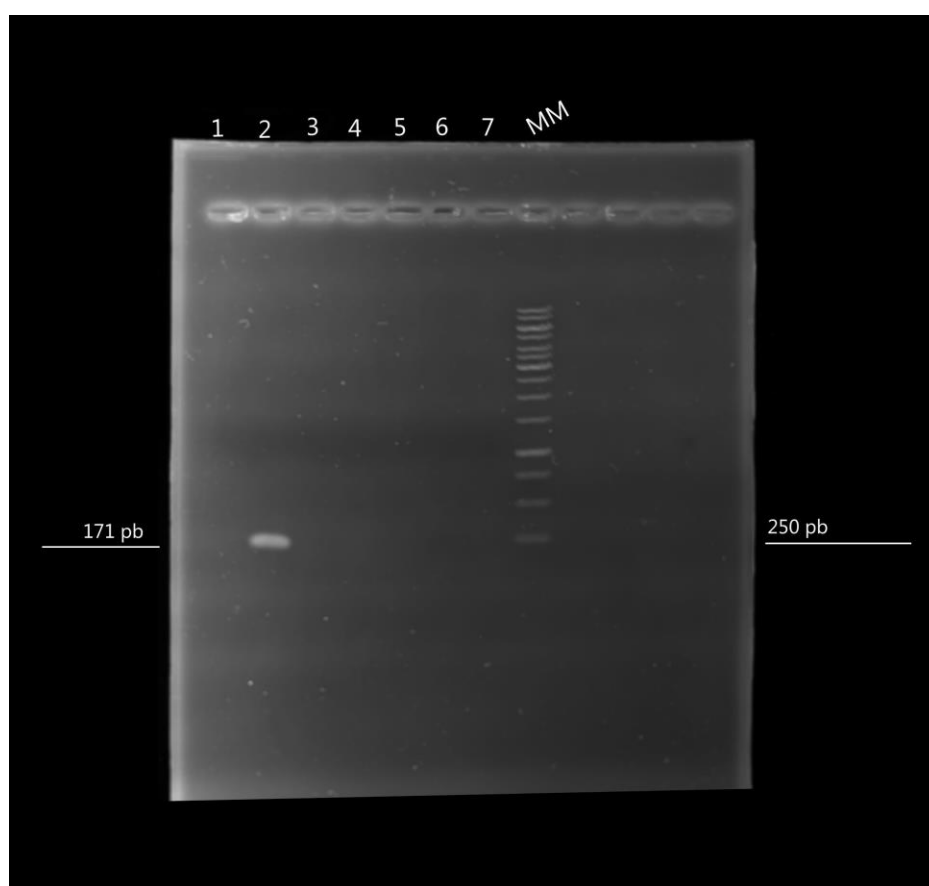


Figura 5 - Amplificação de PCR do gene *copA* (171 pb) do agrupamento gênico de resistência ao cobre *copABCD*. Poços: 1 (306); 2 (LM199); 3 (A44); 4 (CAJ 45); 5 (*pool 1*); 6 (*pool 2*); 7 (branco); MM indica o marcador molecular GeneRuler Ladder 1kb).

Os isolados Cu^{T+} e Cu^T testados não apresentaram amplificações para os genes testados do agrupamento de resistência ao cobre *copLAB* e *copABCD*, apenas os controles amplificaram as bandas esperadas. Isso se dá, provavelmente por não apresentarem tais plasmídeos e a menor susceptibilidade dos isolados ao cobre possivelmente está relacionado a outros mecanismos.

3.5 Formação de biofilme

Biofilme é um fator de virulência em *X. citri*, relacionado à capacidade de produção de exopolissacarídeos (EPS) (YAN; HU; WANG, 2012). Biofilme protege contra dessecação e está associado a adesão durante a fase epifítica da bactéria (RIGANO *et al.*, 2007). Mutantes para EPS perdem capacidade de infectar o hospedeiro citros. Assim foi medido a formação de biofilme do isolados para analisar uma possível relação com a maior tolerância dos mesmos.

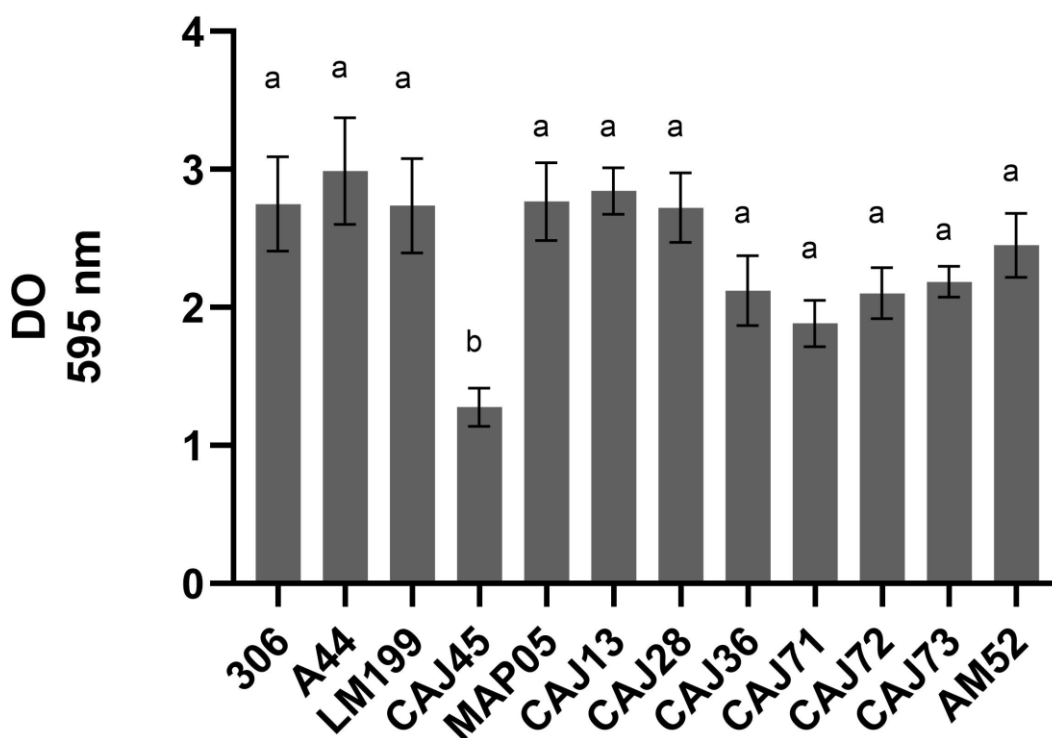


Gráfico 1 - Médias das leituras das DO_{595nm} do teste de biofilme corado com cristal violeta. Valores que são significativamente diferentes, são indicados por letras diferentes (a, b). Os ensaios de biofilme foram repetidos três vezes com quatro repetições de cada vez e resultados semelhantes. Barras verticais representam o erros padrão das médias. O conjunto de dados foi testado quanto sua distribuição gaussiana através do teste de Shapiro-Wilk. Havendo distribuição normal, avaliamos se havia diferença entre os isolados pelo teste de análise de variância ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey.

Verificamos uma diferença significativa na formação de biofilme da linhagem mais tolerante CAJ 45 comparada as demais linhagens testadas e aos controles Cu^R e Cu^S (Gráfico 1). A linhagem CAJ 45 apresentou uma redução na formação de biofilme, dado este inesperado. Já os demais isolados Cu^T não apresentaram nenhuma alterações significativa.

3.6 Motilidade

A motilidade está relacionada à capacidade de infecção, é importante durante a fase epifítica de vida da bactéria, e permite a entrada desta nos tecidos da planta que subsequentemente leva ao desenvolvimento do cancro cítrico (MALAMUD *et al.*, 2011). Desta forma, motilidade constitui um marcador importante para capacidade infectiva e gostaríamos de avaliar seu status em isolados tolerantes ao cobre.

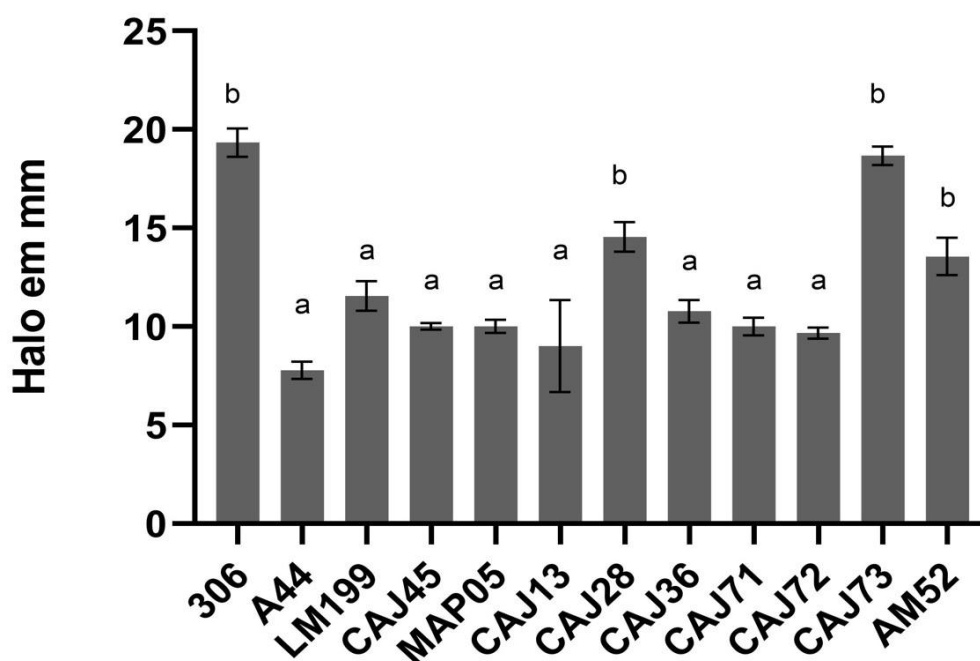


Gráfico 2 - Médias dos diâmetros de formação dos halos de motilidade, medidos em milímetros, após 72 horas. Valores significativamente diferentes, são indicados por letras diferentes (a, b). Barras verticais representam os erros padrão das médias. O conjunto de dados foi testado quanto sua distribuição gaussiana através do teste de Shapiro-Wilk. Sendo a distribuição normal, avaliamos se havia diferença entre os isolados pelo teste de análise de variância ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey (Gráfico 2).

Os isolados CAJ28, CAJ73 e AM52 apresentaram maior motilidade que os demais testados, incluindo-se aqui os controles positivos Cu^{R} (Gráfico 2). Além disto, o controle negativo Cu^{S} 306 também apresentou maior motilidade tal como os isolados CAJ28, CAJ73 e AM52. Finalmente, o isolado $\text{Cu}^{\text{T+}}$ CAJ 45 apresentou motilidade em meio semi-sólido similar aquela observada para os isolados resistentes A44 e LM199.

3.7 Avaliação de destoxificação a antibióticos

A resistência a cobre conferida pelo agrupamento gênico *copLAB* ocorre pois estecodificam para proteínas que se ligam aos íons cobre promovendo um sequestro do metal na célula (COOKSEY, 1990; VOLOUDAKIS *et al.*, 2005). Já no agrupamento gênico *copABCD* o mecanismo de destoxificação de cobre é similar ao mecanismo do *copLAB*, uma vez que há a presença de proteínas peri plasmáticas capazes de se ligar ao metal, em altas concentrações de cobre (COOKSEY; AZAD, 1992).

Como observado acima, os isolados Cu^{T} e $\text{Cu}^{\text{T+}}$ não possuem marcadores plasmidiais e provavelmente cromossômicos para resistência ao cobre. Desta forma, maior potencial de destoxificação de metais nestes isolados pode estar relacionado à presença e/ou maior atividade de bombas de efluxo de multirresistência que garantam a homeostase de diversos antimicrobianos (HERNANDO-AMADO *et al.*, 2016; (ALCALDE-RICO *et al.*, 2016). Para testar esta hipótese, as linhagens Cu^{T} e $\text{Cu}^{\text{T+}}$ foram expostas a 3 concentrações de 4 antibióticos comerciais (ácido nalidíxico, clorafenicol, canamicina e rifampicina) para averiguar sua maior ou menor capacidade de destoxificação.

Como resultado, linhagens não apresentaram crescimento em todas as concentrações de canamicina e rifampicina, capazes de inibir nosso controle Cu^{S} X. *citri* 306, porém, mostraram-se resistentes a clorafenicol (12,5 $\mu\text{g/mL}$, 6,25 $\mu\text{g/mL}$, 3 $\mu\text{g/mL}$) crescendo em todas as concentrações testadas. O ácido nalidíxico (30 $\mu\text{g/mL}$, 15 $\mu\text{g/mL}$, 7,5 $\mu\text{g/mL}$) foi capaz de inibir o crescimento de todas as linhagens, menos da linhagem $\text{Cu}^{\text{T+}}$ CAJ 45 que apresentou crescimento na concentração mais baixa (7,5 $\mu\text{g/mL}$).

4 DISCUSSÃO

A partir de 2009, a legislação sobre o controle do cancro cítrico no estado de São Paulo começou a ser abrandada, permitindo que árvores infectadas permaneçam nos pomares. Como forma de controle efetivo da doença, a aplicação regular de sprays com formulações contendo cobre é realizada de forma periódica (FERENCE *et al.*, 2018). Por conta de sua utilização massiva e constante no campo, surge a necessidade de monitoramento se está ocorrendo uma seleção de bactérias resistentes ao metal, visto que já foram encontrados isolados Cu^{R} na Argentina (CANTEROS, 1999) e Cu^{T} no Brasil (MARIN *et al.*, 2019).

Em nossas coletas foram obtidos até momento 390 isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e selecionados 89 que foram classificados quanto a sua faixa de crescimento em meio com cobre. O isolado CAJ 45 foi o único que apresentou crescimento acima da faixa de tolerância, crescendo de 300 mg/L até 400 mg/L. Porém, este crescimento foi observado de forma intermitente, e o mesmo não apresentou a presença dos plasmídeos de resistência característicos. Desta forma, CAJ 45 foi classificado como mais tolerante, $\text{Cu}^{\text{T+}}$. Nove isolados se mostraram tolerantes e os demais suscetíveis ao cobre, não havendo nenhum isolado Cu^{R} com a presença de plasmídeos contendo genes marcadores já descritos (BEHLAU *et al.*, 2013; RICHARD *et al.*, 2017).

Bactérias do gênero *Xanthomonas* sensíveis, tolerantes e resistentes possuem em seus cromossomos os genes de homeostase ao cobre (*cohLAB*), que são homólogos aos genes de resistência plasmidiais *copLAB* (BEHLAU *et al.*, 2011, BEHLAU *et al.*, 2016). Os genes de homeostase são essenciais, estão presentes em todas as bactérias Cu^{S} , Cu^{T} e Cu^{R} (MARIN *et al.*, 2019) e são responsáveis por regular e preservar a quantidade de cobre no meio intracelular. Garantindo assim, níveis ideais para realização de processos metabólicos na célula e evitando que o excesso do metal cause efeitos nocivos (ARGÜELLO *et al.*, 2013). Além disso, a resistência ao cobre é garantida por plasmídeos, e dependem da regulação e ação feita por vários genes. Desta forma, acredita-se que a probabilidade de aparecimento espontâneo de resistência em uma população seja baixa (BEHLAU *et al.*, 2011).

Nenhum dos 89 isolados deste trabalho parecem possuir genes característicos

dos agrupamentos gênicos que conferem resistência, *copLAB* e *copABCD*. Possivelmente, os isolados podem suportar maiores concentrações de cobre devido à presença de bombas de efluxo, que regulam a homeostase ao cobre (COOKSEY, 1990) ou maior expressão dos genes cromossômicos de homeostase de cobre *cohLAB*.

Nos testes de biofilme buscou-se um paralelo entre maior tolerância ao cobre e maior produção de biofilme. Tal se deve pelo fato de que o biofilme é uma característica conhecida por proteger as bactérias do estresse ambiental (BRANDA *et al.*, 2005) e de antimicrobianos (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000). Em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* quando há uma mutação do gene de *nxA*, essencial para a formação de EPS, a bactéria produz menos biofilme. Há também uma redução na virulência em testes *in planta*, e a bactéria se torna mais susceptível a diferentes antimicrobianos (YAN; HU; WANG, 2012).

Devido ao biofilme auxiliar de forma geral em maior tolerância a compostos e estresse, esperávamos que nossos isolados tolerantes Cu^T e Cu^{T+} apresentassem maior produção de biofilme do que a linhagem sensível Cu^S *X. citri* 306. Isso, porém, não ocorreu com o isolado Cu^{T+} CAJ 45 que apresentou uma significativa menor formação de biofilme dentre todos os isolados. CAJ 45 apresentou menor formação de biofilme também quando comparado aos controles Cu^R LM199 e A44 e os isolados Cu^T .

Já as demais linhagens Cu^T não apresentaram diferenças significativas na formação de biofilme entre si, indicando que os mecanismos atuantes para maior tolerância de cobre não devem estar acarretando uma maior produção de biofilme. Motilidade, assim como biofilme, constitui importante fator de virulência necessário na fase epifítica e para infecção (MALAMUD *et al.*, 2011). Nos testes realizados, a motilidade não parece estar conectada a maior tolerância ao cobre visto que dos 9 isolados analisados, apenas 3 (CAJ 28, CAJ 73 e AM 52) mostraram aumento nesta atividade se comparado aos controles positivos Cu^R LM199 e A44. Os demais isolados cresceram sem alterações significativas.

Com relação ao isolado CAJ 45 que apresentou crescimento em concentrações mais altas de cobre (até 400 mg/L), e se mostrou resistente a concentração mais baixa testada para o antibiótico ácido nalidíxico, pode haver maior atividade de bomba de

efluxo de multirresistência. Tais bombas podem ter ação inespecífica, sendo capazes de gerar efluxo de uma variedade de substâncias diferentes, incluindo antibióticos e metais como o cobre (ALCALDE-RICO *et al.*, 2016).

Finalmente, a maior tolerância ao cobre dos isolados $\text{Cu}^{\text{T}+}$ e $\text{Cu}^{\text{T}+}$ pode estar relacionada a outros mecanismos como maior expressão dos genes cromossomais de homeostase, como *cohLAB*, ou a bombas de efluxo, indicando possíveis indícios que apontem para uma maior adaptabilidade às condições em que tais isolados estão expostas atualmente em campo.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCALDE-RICO, M.; HERNANDO-AMADO, S.; BLANCO, P.; MARTINEZ, J. L. Multidrug Efflux Pumps at the Crossroad between Antibiotic Resistance and Bacterial Virulence. **Front Microbiol**, 7, p. 1483, 2016.

ARGUELLO, J. M.; RAIMUNDA, D.; PADILLA-BENAVIDES, T. Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. **Front Cell Infect Microbiol**, 3, p. 73, 2013.

BASIM, H.; MINSAVAGE, G. V.; STALL, R. E.; WANG, J. F. Characterization of a unique chromosomal copper resistance gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Appl Environ Microbiol**, 71, n. 12, p. 8284-8291, Dez 2005.

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*. **Eur. J. Plant Pathol.**, 133, p. 949-963, 2012.

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**, v. 77, n. 12, p. 4089–4096, 2011.

BEHLAU, F.; FONSECA, A. E.; BELASQUE JR., J. A comprehensive analysis of the Asiatic citrus canker eradication programme in São Paulo state, Brazil, from 1999 to 2009. **Plant Pathology**, 65, p. 1390-1399, 2016.

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

BERGAMIN FILHO, A., AMORIM, L., LARANJEIRA, F.F. & GOTTWALD, T.R. Epidemiology of citrus canker in Brazil with and without the Asian citrus leafminer. **Proceedings, International citrus canker research workshop**, Fort Pierce, FL. 2000. p. 6.

BRANDA, S. S.; VIK, S.; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. **Trends Microbiol**, 13, n. 1, p. 20-26, Jan 2005.

BRUNETTO, G.; BASTOS DE MELO, G. W.; TERZANO, R.; DEL BUONO, D. Copper accumulation in vineyard soils: Rhizosphere processes and agronomic practices to limit its toxicity. **Chemosphere**, 162, p. 293-307, Nov 2016.

CANTEROS, B. I. Copper resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. In: MAHADEVAN, A. (Ed.). **Plant pathogenic bacteria. Proceedings of the International Society of Bacteriology**, Centre for Advanced Study in Botany. Chennai, India: University of Madras, 1999. p. 455-459.

CHAGAS, M. C. M.; PARRA, J. R. P.; NAMEKATA, T.; HARTUNG, J. S. *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) and its relationship with the citrus canker bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* in Brazil. **Neotrop. Entomol.**, 30, n. 1, p. 55-59, 2001.

CHILLAPPAGARI, S.; SEUBERT, A.; TRIP, H.; KUIPERS, O. P. Copper stress affects iron homeostasis by destabilizing iron-sulfur cluster formation in *Bacillus subtilis*. **J Bacteriol**, 192, n. 10, p. 2512-2524, May 2010.

COLETTA-FILHO, H. D.; TAKITA, M. A.; SOUZA, A. A.; NETO, J. R. Primers based on the *rpf* gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in naturally and artificially infected citrus plants. **J Appl Microbiol**, 100, n. 2, p. 279-285, Feb 2006. Research Support, Non-U.S. Gov't.

COOKSEY, D. A. Plasmid-Determined Copper Resistance in *Pseudomonas syringae* from *Impatiens*. **Appl Environ Microbiol**, 56, n. 1, p. 13-16, Jan 1990.

COOKSEY, D. A.; AZAD, H. R. Accumulation of copper and other metals by copper-resistant plant-pathogenic and saprophytic pseudomonads. **Appl Environ Microbiol**, 58, n. 1, p. 274-278, Jan 1992.

CORNU, J. Y.; HUGUENOT, D.; JEZEQUEL, K.; LOLLIER, M. et al. Bioremediation of copper-contaminated soils by bacteria. **World J Microbiol Biotechnol**, 33, n. 2, p. 26, Feb 2017.

DA SILVA, A. C.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, 417, n. 6887, p. 459-463, May 23 2002.

FERENCE, C. M.; GOCHEZ, A. M.; BEHLAU, F.; WANG, N. et al. Recent advances in the understanding of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* pathogenesis and citrus canker disease management. **Mol Plant Pathol**, 19, n. 6, p. 1302-1318, Jun 2018.

FUNDECITRUS. 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>. Acesso em: 30 out. 2021.

GOTTWALD, T. R.; SUN, X.; RILEY, T.; GRAHAM, J. H.; FERRANDINO, F.; TAYLOR, E. L. Geo-referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida. **Phytopathology**, v. 92, n. 4, p. 361–377, 2002.

HERNANDO-AMADO, S.; BLANCO, P.; ALCALDE-RICO, M.; CORONA, F. et al. Multidrug efflux pumps as main players in intrinsic and acquired resistance to antimicrobials. **Drug Resist Update**, 28, p. 13-27, Sep 2016.

HINIKER, A.; COLLET, J. F.; BARDWELL, J. C. Copper stress causes an in vivo requirement for the Escherichia coli disulfide isomerase DsbC. **J Biol Chem**, 280, n. 40, p. 33785-33791, Oct 7 2005.

LEE, Y. A.; HENDSON, M.; PANOPOULOS, 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. **J Bacteriol**, 176, n. 1, p. 173-188, Jan 1994.

MALAMUD, F.; CONFORTE, V. P.; RIGANO, L. A.; CASTAGNARO, A. P.; MARANO, M. R.; MORAIS DO AMARAL, A.; VOJNOV, A. A. HrpM is involved in glucan biosynthesis, biofilm formation and pathogenicity in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 9, p. 1010–1018, 2012.

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

MARIN, T. G. S.; GALVANIN, A. L.; LANZA, F. E.; BEHLAU, F. Description of copper tolerant *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and genotypic comparison with sensitive and resistant strains. **Plant Pathology**, 68, n. 6, p. 1088–1098, 2019

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F. et al. O retrato da citricultura brasileira. Ribeirão Preto, SP: Marcos Fava Neves, 2010. 137

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annu Rev Microbiol**, 54, p. 49-79, 2000.

RICHARD, D.; BOYER, C.; VERNIERE, C.; CANTEROS, B. I. et al. Complete Genome Sequences of Six Copper-Resistant *Xanthomonas citri* pv. *citri* Strains Causing Asiatic Citrus Canker, Obtained Using Long-Read Technology. **Genome Announc**, 5, n. 12, Mar 23 2017.

RIGANO, L. A.; SICILIANO, F.; ENRIQUE, R.; SENDIN, L. et al. Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Mol Plant Microbe Interact**, 20, n. 10, p. 1222-1230, Oct 2007.

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**, 79, p. 861-865, 1989.

VOLOUDAKIS, A. E.; REIGNIER, T. M.; COOKSEY, D. A. Regulation of resistance to copper in *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. **Appl Environ Microbiol**, 71, n. 2, p. 782-789, Feb 2005.

YAN, Q.; HU, X.; WANG, N. The novel virulence-related gene *nlxA* in the lipopolysaccharide cluster of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* is involved in the production of lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide, motility, biofilm formation and stress resistance. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 8, p. 923–934, 2012.