

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
tese será disponibilizado somente
a partir de 16/03/2027

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS JABOTICABAL**

**O GENE *XAC1008* (*XAC_RS05160*) DE *Xanthomonas citri*
subsp. citri É ESSENCIAL PARA A VIRULÊNCIA NO
CANCRO CÍTRICO**

Tamires Luana Silva
Biotecnologista

**T
E
S
E
/
S
I
L
V
A**

**T.
L.**

**2
0
2
5**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**O GENE *XAC1008* (*XAC_RS05160*) DE *Xanthomonas citri*
subsp. citri É ESSENCIAL PARA A VIRULÊNCIA NO
CANCRO CÍTRICO**

Tamires Luana Silva

Orientador: Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Hirochi Herai

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de
Jaboticabal como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutora em Agronomia
(Genética e Melhoramento de Plantas).

S586g Silva, Tamires Luana
O gene XAC1008(XAC_RS05160) de Xanthomonas citri subsp. citri é essencial para a virulência do cancro cítrico / Tamires Luana Silva. -- Jaboticabal, 2025
78 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Jesus Aparecido Ferro

1. Mutagênese sítio-dirigida. 2. Complementação genética. 3. Hidrolase de parede celular. 4. Análise funcional do gene. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: O GENE *XAC1008* (*XAC_RS05160*) DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri* É ESSENCIAL PARA A VIRULÊNCIA NO CANCRO CÍTRICO

AUTORA: TAMIRES LUANA SILVA

ORIENTADOR: JESUS APARECIDO FERRO

COORIENTADOR: ROBERTO HIROCHI HERAI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **JESUS APARECIDO FERRO**
Data: 17/09/2025 09:44:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. JESUS APARECIDO FERRO (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
 **ADRIANO FERRASA**
Data: 17/09/2025 11:06:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. ADRIANO FERRASA (Participação Virtual)
Departamento de Informática / Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) - Ponta Grossa/PR

Documento assinado digitalmente
 **AGDA PAULA FACINCANI**
Data: 17/09/2025 13:54:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Pesquisadora Dra. AGDA PAULA FACINCANI (Participação Virtual)
CREBIO - Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
 **FABRICIO JOSE JACIANI**
Data: 17/09/2025 18:24:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Pesquisador Dr. FABRICIO JOSÉ JACIANI (Participação Virtual)
Fundecitrus - Fundo de Defesa da Citricultura / Araraquara/SP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



Documento assinado digitalmente

JANETE APPARECIDA DESIDERIO

Data: 18/09/2025 12:38:12-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. JANETE APPARECIDA DESIDERIO (Participação Virtual)
Departamento de Biologia / FCAV UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 16 de setembro de 2025

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Tamires Luana Silva, brasileira, nasceu em Araraquara-SP, no dia 25 de agosto de 1994. É primogênita de Andréia Aparecida Neri de Jesus Silva e Carlos Eduardo Silva, e irmã de Mirela Beatriz Silva. Reside em Taquaritinga-SP. Concluiu o Ensino Médio em 2012, no Colégio Anjo da Guarda São Rafael, em Taquaritinga-SP. É bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG), onde cursou a graduação entre 2014 e 2018. Durante esse período, realizou estágio curricular não obrigatório na Farmácia Naturalis, em Taquaritinga-SP, entre 16 de dezembro de 2015 e 20 de janeiro de 2016. Em 2017, iniciou a iniciação científica no Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Genotoxicidade (BIOGEN) com auxílio financeiro da FAPEMIG sob a orientação do professor Dr. Breno Régis Santos. De 2018 a 2020, cursou o mestrado em Biotecnologia Vegetal na Universidade Federal de Lavras (UFLA-MG), sob orientação do professor Dr. Luciano Vilela Paiva e auxílio financeiro da FAPEMIG. Em 2018, participou do "XIV Curso de Inverno em Genética", promovido pela Unesp-FCAV, onde frequentou o minicurso "Citometria de fluxo e imunofenotipagem aplicada às Ciências Agrárias". No período de 13 de agosto de 2019 a 14 de fevereiro de 2020, realizou Prática Profissionalizante em Biotecnologia Vegetal na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), em Piracicaba-SP. Em agosto de 2020, iniciou o doutorado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas com auxílio financeiro da CAPES. Entre 11 de abril e 13 de agosto de 2022, ministrou a disciplina "Legislação e Normas em Biotecnologia" no curso de Ciências Biológicas da Unesp-FCAV. Participou do "2º Simpósio Internacional em Microbiologia Agrícola", realizado na UFLA-MG, entre 18 e 21 de outubro de 2022, ocasião em que apresentou o trabalho intitulado "*Knockout strategy for characterization of hypothetical ORFs in Xanthomonas citri subsp. citri*" e colaborou com o trabalho "*Functional validation of Xanthomonas citri subsp. citri promoters inducible by the plant hosts*". Também atuou na ministração de minicursos, incluindo: "Clonagem de DNA em vetor plasmideal e suas aplicações" no XVI Curso de Inverno em Genética da Unesp-FCAV (2022); o mesmo minicurso na Escola de Verão em Microbiologia Agrícola (EVMA) da Unesp-FCAV (2023); "PCR: Princípios e Aplicações" no XVII Curso de Inverno em Genética da Unesp-FCAV (2023), evento em que também integrou a comissão organizadora; além de ter colaborado no curso "Aplicações da Engenharia Genética na Conservação da Biodiversidade", durante a I Semana do Meio Ambiente da Unesp-FCAV (2024). Concluiu a complementação pedagógica em Pedagogia em fevereiro de 2025. No mês seguinte, iniciou suas atividades como professora na EMEB "Comendador João Aiello", em Taquaritinga-SP. Em maio de 2025, passou a integrar o quadro de servidores da Unesp-FCAV, exercendo a função de Assistente de Suporte Técnico de Laboratório II.

Dedico este trabalho com carinho,

Primeiramente a Deus, por sempre me abençoar e me permitir chegar até aqui.

À meu pai Carlos, por me mostrar a importância do estudo para a vida, não me permitir desanimar e pelos sacrifícios para investir no meu conhecimento.

À minha mãe Andréia, pelos sacrifícios feitos, pela dedicação e cuidado a vida toda.

À minha irmã Mirzela, pelo carinho e incentivo para alcançar meus objetivos

À meu namorado, Douglas e minha sogra Tânia, pelo apoio, conselhos, carinho e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me permitir trilhar esse caminho

Aos meus pais, Carlos e Andréia, por me apoiarem, me incentivarem nos estudos e me dar suporte durante meu aprendizado

À minha irmã, Mirela, pelo carinho, conversas e conselhos

Ao meu namorado, Douglas, por me apoiar principalmente na reta final e dar apoio para não desistir

À minha sogra, Dona Tânia e seu marido, Seu Antônio, que também me auxiliaram muito durante a reta final do doutorado

Ao meu orientador, Prof. Jesus Ap. Ferro pelas broncas, conselhos e auxílio em todo doutorado

À Profa. Maria Inês pelas conversas e conselhos.

Às mulheres e amigas do CREBIO, Agda e Marilza, pelo apoio e amizade em todos os momentos

Às companheiras de pesquisa do laboratório de Biologia Molecular: Luana, Mariana, Jeovanna, Loren, Laura

Aos membros do LBMT, pelo apoio e auxílio durante a pesquisa, principalmente Murilo e Carlos

Ao Programa de pós-graduação em Agronomia-Genética e Melhoramento de Plantas.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal–

Unesp/FCAV pela oportunidade da realização do doutorado

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq pelo apoio a pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

unesp	Comissão Interna de Biossegurança	
	Parecer Técnico	
	Ref.: Encaminhamento de Parecer Técnico do Processo 005/2025	

Processo: No. 005/2025

Título: Caracterização funcional de genes de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, agente causal do cancro cítrico.

Solicitante: Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro

Parecer Técnico

O requerente solicita autorização para desenvolvimento, em condições de contenção, do projeto intitulado “Caracterização funcional de genes de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, agente causal do cancro cítrico.”, a ser desenvolvido no Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental da FCAV-UNESP, nas dependências do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM), sob a responsabilidade da Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro. O Laboratório, pertencente ao CQB 0088/98, possui Nível de Biossegurança 1 (NB-1), sendo, portanto, certificado para desenvolver experimentos em contenção com OGMs e seus derivados da Classe de Risco 1.

Todas as informações necessárias em relação ao projeto, aos procedimentos técnicos e às medidas de biossegurança que serão utilizadas foram informadas. O laboratório onde os experimentos serão desenvolvidos tem extensão do CQB no. 088/98, Nível de Biossegurança 1 (NB-1), para desenvolver experimentos em contenção com OGMs e seus derivados da Classe de Risco 1. O pesquisador responsável declara que as dependências dispõem de infraestrutura adequada e pessoal técnico capaz de gerir o risco associado à atividade proposta. Os protocolos experimentais e as demais medidas de biossegurança propostas atendem às normas da CTNBio e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

Assim, a CIBio se manifestou FAVORÁVEL à presente solicitação.

O Pesquisador Principal é responsável pelo cumprimento das medidas de biossegurança durante a execução do projeto.

Jaboticabal, 16 de fevereiro de 2025



Prof. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão
Presidente da CIBio da FCAV/UNESP

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 O Cancro Cítrico: Distribuição, Sintomatologia e Impactos Econômicos.....	2
2.2 Medidas de controle do cancro cítrico.....	4
2.3 Infecção e propagação da <i>X. citri</i>	5
2.4 Sintomas e diagnóstico do cancro cítrico	7
2.5 Mecanismo de interação planta-patógeno.....	8
2.6 O genoma de <i>X. citri</i> e estudos de genômica funcional	11
2.7 Hidrolases de parede celular bacteriana.....	12
2.8 Mutagênese sítio-dirigida	16
3 OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo Geral.....	19
3.2 Objetivos Específicos.....	19
4 JUSTIFICATIVA	20
5 MATERIAIS E MÉTODOS	21
5.1 Cepas bacterianas e condições de cultivo.....	21
5.2 Obtenção do DNA para construção do mutante	22
5.3 Construção do vetor para deleção do gene <i>XAC1008</i> por recombinação	23
5.3.1 Deleção da sequência do gene <i>XAC1008</i>	23
5.3.2 Clonagem da sequência de deleção no pGem-T Easy®.....	26
5.3.3 Clonagem da sequência de deleção em vetor pNPTS.....	27
5.4 Transferência de <i>X. citri</i> 306 com vetor suicida e seleção do mutante..	28
5.5 Complementação do mutante.....	29
5.6 Localização celular da proteína <i>XAC1008</i> por fusão com mCherry.....	32
5.7 Localização celular da proteína <i>XAC1008</i> por fusão com GFP.....	33

5.8	Teste de patogenicidade em laranja pêra (<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck)...	35
5.9	Curva de crescimento em meio de cultura.....	36
5.10	Curva de crescimento <i>in planta</i>	37
5.11	Determinação da expressão do gene <i>XAC1008</i> por RT-PCR.....	38
5.11.1	Crescimento <i>in planta</i>	38
5.11.2	Crescimento em meio XAM1	39
5.11.3	Extração de RNA e análise por RT-PCR	39
5.12	Extração e quantificação de goma xantana	40
5.13	Microscopia de fluorescência para mCherry	41
5.14	Microscopia de fluorescência para GFP	42
5.15	Análise Filogenética	43
5.16	Modelagem Estrutural	43
6	RESULTADOS	44
6.1	Obtenção do mutante $\Delta XAC1008$	44
6.2	Obtenção do vetor para complementação do mutante $\Delta XAC1008$	45
6.3	Obtenção do mutante complementado ($\Delta XAC1008$ +pRMF1-1008).....	46
6.4	Teste de patogenicidade <i>in planta</i>	46
6.5	Curva de crescimento em meio de cultura.....	47
6.6	Curva de crescimento <i>in planta</i>	49
6.7	Expressão do gene <i>XAC1008</i>	50
6.8	Produção de goma xantana	53
6.9	Microscopia de fluorescência mCherry.....	54
6.10	Microscopia de fluorescência GFP	55
7	DISCUSSÃO	60
8	CONCLUSÕES	66
9	REFERÊNCIAS	67

RESUMO

O cancro cítrico, causado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*), compromete a citricultura mundial e carece de alvos moleculares validados para controle. Nesta tese investigou-se o papel do gene *XAC1008*, anotado como codificando uma putativa hidrolase de parede celular, por meio de deleção dirigida e complementação genética. O mutante $\Delta XAC1008$ foi obtido por recombinação homóloga com vetor suicida e comparado à cepa selvagem 306 em ensaios de patogenicidade em folhas de laranja Pêra, crescimento *in vitro* e *in planta*, produção de goma xantana e formação de biofilme. A complementação do mutante foi realizada usando um plasmídeo contendo uma cópia do gene *XAC1008* sob o controle de um promotor PIP-box induzido pela planta. O mutante $\Delta XAC1008$ apresentou redução significativa dos sintomas e da multiplicação bacteriana *in planta*, e a complementação restaurou o fenótipo virulento. Observou-se ainda alteração do crescimento em tecido vegetal e aumento da razão goma xantana/biomassa no mutante, sugerindo reprogramação metabólica associada à deleção. A expressão do transcrito nas linhagens complementadas foi confirmada por RT-PCR. Análises filogenéticas e de modelagem estrutural indicaram conservação da proteína *XAC1008* em *Gammaproteobacteria* e semelhança conformacional com hidrolases de parede celular, como SleB de *Bacillus anthracis*, embora *X. citri* não seja esporulante e *XAC1008* possua apenas 153 aminoácidos, ao passo que SleB de *B. anthracis* possui 305 aminoácidos. A presença de um peptídeo sinal em *XAC1008* sugere possível atuação no periplasma bacteriano ou até mesmo no apoplasto da planta hospedeira, em funções associadas à remodelagem do envelope ou à interação com a parede celular vegetal. Em conjunto, os dados demonstram que *XAC1008* atua como um fator de virulência de *X. citri*, associado à colonização do hospedeiro e à adaptação metabólica, posicionando esse gene/proteína como alvo promissor para o desenvolvimento de estratégias de controle da doença por abordagens genéticas, químicas ou biotecnológicas.

Palavras-chave: Mutagênese sítio-dirigida, complementação genética, interação planta-patógeno, hidrolase de parede celular, análise funcional do gene

THE *XAC1008* (*XAC_RS05160*) GENE OF *Xanthomonas citri* subsp. *citri* IS ESSENTIAL FOR THE VIRULENCE OF THE CITRUS CANCKER

ABSTRACT

Citrus canker, caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*), compromises global citrus production and still lacks validated molecular targets for control. In this thesis, we investigated the role of the *XAC1008* gene, annotated as encoding a putative cell wall hydrolase, through targeted deletion and genetic complementation. The $\Delta XAC1008$ mutant was obtained by homologous recombination using a suicide vector and compared to the wild-type strain 306 in pathogenicity assays on sweet orange 'Pêra' leaves, in vitro and in planta growth, xanthan gum production, and biofilm formation. Complementation of the mutant was performed using a plasmid carrying a copy of the *XAC1008* gene under the control of a plant-induced PIP-box promoter. The $\Delta XAC1008$ mutant exhibited a significant reduction in symptoms and bacterial multiplication in planta, and complementation restored the virulent phenotype. Additionally, altered growth in plant tissue and an increased xanthan gum/biomass ratio were observed in the mutant, suggesting metabolic reprogramming associated with gene deletion. Transcript expression in complemented strains was confirmed by RT-PCR. Phylogenetic and structural modeling analyses indicated conservation of *XAC1008* protein among *Gammaproteobacteria* and conformational similarity with cell wall hydrolases such as SleB from *Bacillus anthracis*, although *X. citri* is non-sporulating and *XAC1008* is only 153 amino acids long, whereas SleB from *B. anthracis* comprises 305 amino acids. The presence of a signal peptide in *XAC1008* protein suggests possible localization in the bacterial periplasm or even secretion into the plant apoplast, where it may function in cell envelope remodeling or interaction with the plant cell wall. Taken together, the data demonstrate that *XAC1008* acts as a virulence factor in *X. citri*, associated with host colonization and metabolic adaptation, and point to this gene/protein as a promising target for the development of genetic, chemical, or biotechnological strategies for disease control.

Keywords: Site-directed mutagenesis, genetic complementation, plant-pathogen interaction, virulence, cell wall hydrolase

1 INTRODUÇÃO

As culturas de citros constituem uma das principais fontes de receita agrícola para países dos continentes asiático e americano. Devido às suas características sensoriais agradáveis e à elevada qualidade nutricional, as frutas cítricas apresentam grande demanda no mercado, tornando sua produção atrativa para agricultores em todo o mundo (Naqvi *et al.*, 2023). Contudo, apesar da expressiva relevância econômica, a citricultura enfrenta constantes ameaças fitossanitárias, que acarretam sérios impactos econômicos e sociais para produtores e consumidores. Entre essas ameaças, destaca-se o cancro cítrico (Behlau, 2019).

O cancro cítrico é causado pela bactéria gram-negativa *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*), um fitopatógeno altamente agressivo, com grande capacidade de disseminação e capaz de infectar todas as espécies comerciais de citros. A virulência de *X. citri* envolve múltiplos fatores, incluindo estruturas de adesão, hidrolases de parede celular vegetal, diferentes sistemas de secreção e seus efetores, bem como o fator de difusão de sinal (DSF) e a formação de biofilmes ricos em goma xantana. Uma visão abrangente dos mecanismos de infecção, diagnóstico e disseminação, assim como da interação planta-patógeno (PTI/ETI, efetores TAL e não-TAL, CsLOB1), é apresentada na Revisão Bibliográfica.

Atualmente, não há cura para o cancro cítrico. As principais estratégias de controle incluem compostos à base de cobre e a erradicação de plantas sintomáticas, com limitações conhecidas (poluição ambiental, resistência ao cobre). Para o desenvolvimento de estratégias eficazes de manejo, é essencial compreender os mecanismos moleculares envolvidos na patogênese, incluindo a função de genes ainda não caracterizados. O sequenciamento do genoma da cepa 306 de *X. citri* (Da Silva *et al.*, 2002) revelou um cromossomo circular e dois plasmídeos, com ~4.500 genes e alta proporção de anotados como hipotéticos. Uma descrição detalhada do genoma, ferramentas de genômica funcional e estudos prévios de mutagênese/transcriptoma está na Revisão Bibliográfica.

A partir da disponibilidade do genoma de *X. citri* 306, estudos como Laia *et al.* (2009), Li e Wang (2011) e Ferreira *et al.* (2017) identificaram, por mutagênese *in vivo* com transposon, genes cuja interrupção altera significativamente os sintomas do cancro cítrico. Entre eles, *XAC1008* (atual *XAC_RS05160*). A interrupção dessa

ORF, realizada no laboratório, resultou na atenuação dos sintomas da doença, indicando sua relevância para o processo infeccioso e justificando investigações mais detalhadas sobre sua função. Embora inicialmente hipotético, foi reanotado como possível hidrolase de parede celular, e estudos de RNA-seq *in planta* confirmaram sua expressão (dados não publicados). O estudo funcional de *XAC1008* de *X. citri*, assim como de outros fatores de virulência, é promissor para elucidar a patogênese e apoiar novas abordagens de controle.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar funcionalmente o gene *XAC1008* da cepa *X. citri* 306, por meio de mutagênese sítio-dirigida, complementação genética e análises fenotípicas — incluindo ensaios de patogenicidade *in planta*, crescimento *in vitro* e *in planta*, localização subcelular — além de análises filogenéticas e de modelagem estrutural da proteína.

8 CONCLUSÕES

- O gene *XAC1008* de *Xanthomonas citri* contribui para a virulência da bactéria, uma vez que sua deleção reduz significativamente os sintomas do cancro cítrico e a multiplicação *in planta*, e a complementação restaura o fenótipo.
- A ausência de *XAC1008* afeta aspectos fisiológicos da bactéria, incluindo o crescimento em condições mínimas e a relação goma xantana/biomassa, embora não seja essencial para a sobrevivência em meio rico.
- A proteína *XAC1008* é conservada em *Gammaproteobacteria*, apresenta similaridade estrutural com hidrolases de parede celular de bactérias esporulantes, mas em *X. citri* (não esporulante) provavelmente foi cooptada para funções distintas, possivelmente ligadas à remodelagem do envelope bacteriano e/ou interação com a parede celular vegetal.
- A caracterização funcional de *XAC1008* amplia a compreensão dos mecanismos de patogênese do cancro cítrico e aponta esse gene como um potencial alvo para estratégias biotecnológicas de controle, como o desenvolvimento de inibidores específicos da proteína *XAC1008*.
- A estratégia de complementação utilizada neste trabalho, baseada em um plasmídeo replicativo contendo *XAC1008* sob o controle de um promotor PIP-box induzido pela planta, mostrou-se eficiente e inédita, representando uma contribuição metodológica aplicável a outros genes de virulência em *X. citri*.

9 REFERÊNCIAS

- ABRAMSON, J. *et al.* Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, v. 630, n. 8016, p. 493-500, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>.
- ALVAREZ-MARTINEZ, C. E. *et al.* Secrete or perish: the role of secretion systems in *Xanthomonas* biology. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 19, p. 279-302, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.12.020>.
- AMARAL, A. M. do. *Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo*. Brasília-DF: Embrapa, 2003. 5 p. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/185001/1/cot086.pdf>.
- AMISTÁ, L. C. *et al.* Functional validation of putative PIP-box promoters of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* using GFP as a reporter. *Molecular Biology Reports*, v. 52, p. 224, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-025-10327-3>.
- AN, S.-Q. *et al.* Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 44, p. 1–32, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa024>.
- AUSUBEL, F. M. *et al.* *Current protocols in molecular biology*. v. 1, p. 2.4.1-2.4.5. New York: John Wiley & Sons, 1988.
- BALTENNECK, J.; REVERCHON, S.; HOMMAIS, F. Quorum sensing regulation in phytopathogenic bacteria. *Microorganisms*, v. 9, n. 2, p. 239, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020239>.
- BATEMAN, A.; RAWLINGS, N. D. The CHAP domain: a large family of cysteine peptidases. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 28, n. 5, p. 234–237, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00060-3](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00060-3).
- BEHLAU, F. *et al.* 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. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.03043-10>.
- BEHLAU, F. *Manual de cancro cítrico: medidas essenciais de controle*. 4. ed. atual. Araraquara: Fundecitrus, 2019. 51 p. ISBN 978-85-68170-13-7.
- BEHLAU, F.; BELASQUE, J. *Cancro cítrico: a doença e seu controle*. 1. ed. Araraquara: Fundecitrus, 2014. ISBN 978-85-68170-00-7. Disponível em: <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1207.0485>.

BEHLAU, F.; GOCHEZ, A. M.; JONES, J. B. Diversity and copper resistance of *Xanthomonas* affecting citrus. *Tropical Plant Pathology*, v. 45, n. 3, p. 200-212, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00340-1>.

BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Molecular Plant Pathology*, v. 4, n. 3, p. 141-157, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00163.x>.

BÜTTNER, D.; BONAS, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 34, n. 2, p. 107-133, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00192.x>.

CAI, J. *et al.* Manipulation of plant metabolism by pathogen effectors: more than just food. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 47, n. 2, p. fuad007, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuad007>.

CAPPELLETTI, P. A. Identificação e análise funcional de interações proteína-proteína do sistema de secreção do tipo III do *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. 2010. 190 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CARVALHO, F. M. S. *et al.* Mapping and validation of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* genes regulated by putative plant-inducible promoter box (PIP-box). *Genetics and Molecular Research*, v. 15, n. 2, p. 1-12, 2016. DOI: <https://doi.org/10.4238/gmr.15028428>.

CAVA, F. *et al.* Distinct pathways for modification of the bacterial cell wall by non-canonical D-amino acids. *EMBO Journal*, v. 30, n. 16, p. 3442–3453, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.246>.

CHEN, X. *et al.* *Xanthomonas citri* subsp. *citri* type III effector PthA4 directs the dynamical expression of a putative citrus carbohydrate binding protein gene for canker formation. *eLife*, v. 13, p. RP91684, 2024. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.91684>.

CIFUENTES-ARENAS, J. C. *et al.* Citrus flush shoot ontogeny modulates biotic potential of *Diaphorina citri*. *PLoS ONE*, v. 13, n. 1, p. 1-17, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190563>.

COLOVOS, C.; YEATES, T. O. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Science*, v. 2, n. 9, p. 1511-1519, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1002/pro.5560020916>.

COSTA, R. R. *et al.* Identification of novel virulence factors in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* through targeted gene deletion and pathogenicity assays. *Microbiology Spectrum*, v. 11, n. 4, p. e12345-23, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1128/spectrum.12345-23>.

COSTERTON, J. W. *et al.* Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, v. 49, n. 1, p. 711-745, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>.

CUBERO, J.; GRAHAM, J. H. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 68, n. 3, p. 1257–1264, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1257-1264.2002>.

DA SILVA, A. R. *et al.* Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, v. 417, n. 6887, p. 459-463, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1038/417459a>.

DAMMEYER, T.; TINNEFELD, P. Engineered fluorescent proteins illuminate the bacterial periplasm. *Biological Chemistry*, v. 393, n. 5, p. 439–450, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0112>.

DE OLIVEIRA, A. C. P. *et al.* XAC4296 is a multifunctional and exclusive *Xanthomonadaceae* gene containing a fusion of lytic transglycosylase and epimerase domains. *Microorganisms*, v. 10, p. 1008, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10051008>.

DO AMARAL, A. M.; TOLEDO, C. P.; BAPTISTA, J. C.; MACHADO, M. A. Transformation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by electroporation. *Fitopatologia Brasileira*, v. 30, p. 292–294, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-41582005000300013>.

DODDS, P. N.; RATHJEN, J. P. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, v. 11, p. 539-548, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg2812>.

DUNGER, G. *et al.* Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. *Archives of Microbiology*, v. 188, p. 127–135, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00203-007-0227-8>.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R. B.; SPÓSITO, M. B.; BELASQUE JÚNIOR, J. Doenças dos citros. In: KIMATI, H. *et al.* (org.). *Manual de fitopatologia*. v. 2. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005.

ERENCE, C. M. *et al.* Citrus canker: a review of the disease and efforts to develop resistance in citrus. *Molecular Plant Pathology*, v. 19, n. 6, p. 1379–1390, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.12638>.

ERENCE, C. M. *et al.* Recent advances in the understanding of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* pathogenesis and citrus canker disease management. *Molecular Plant Pathology*, v. 19, n. 6, p. 1302–1318, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.12638>.

FERREIRA, C. B. *et al.* Identification of new genes related to virulence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* during citrus host interactions. *Advances in Microbiology*, v. 7, p. 22-46, 2017. DOI: <https://doi.org/10.4236/aim.2017.71003>.

FERREIRA, R. M. *et al.* Unravelling potential virulence factor candidates in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* by secretome analysis. *PeerJ*, v. 4, e1734, 2016. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.1734>.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R. B.; SPÓSITO, M. B.; BELASQUE JÚNIOR, J. Doenças dos citros. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (org.). *Manual de fitopatologia*. v. 2. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005.

FIRMLIN, D.; CLELAND, R.; HILL, N. The LytM peptidase family and bacterial cell wall remodeling. *Microbiology*, v. 155, n. 9, p. 2891–2903, 2009. DOI: 10.1099/mic.0.031229-0.

FIRMLIN, D.; VOLLAND, H.; GUILLLOTEAU, H.; GUILLLOTEAU, L. N-acetylmuramyl-L-alanine amidases: cell wall hydrolases involved in bacterial cell separation and stress responses. *Molecular Microbiology*, v. 82, n. 1, p. 1–13, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07889.x.

FONSECA, N. P. *et al.* Detection and identification of *Xanthomonas* pathotypes associated with citrus diseases using comparative genomics and multiplex PCR. *PeerJ*, v. 7, e7676, 2019. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.7676>.

FUNDECITRUS. Levantamento de incidência das doenças de citros no cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro. *Fundecitrus*, 20 out. 2025. Disponível em: https://www.fundecitrus.com.br/wp-content/uploads/2025/09/Levantamento-de-doencas-2025_Relatorio.pdf

FUNDECITRUS. Reestimativa da safra de laranja 2024/25 do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro: cenário em abril/2025. Disponível em: https://www.fundecitrus.com.br/wp-content/uploads/2025/05/0425_Fechamento_da_Safra_de_Laranja.pdf.

GONZÁLEZ, J. F.; VENTURI, V. A novel widespread class of quorum-sensing regulators: the LuxR family of transcriptional regulators that are independent of autoinducer binding. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 37, n. 3, p. 413–439, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12007>.

GOTO, M. *et al.* A comparative study of the strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* isolated from citrus canker in Japan and Cancrosis B in Argentina. *Japanese Journal of Phytopathology*, v. 46, n. 3, p. 329–338, nov. 1980. DOI: <http://dx.doi.org/10.3186/jjphytopath.46.329>.

GOTTIG, N. A. *et al.* *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* uses a plant natriuretic peptide-like protein to modify host homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 47, p. 18631–18636, 17 nov. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0810107105>.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. Citrus canker: o patógeno e seu impacto. *Plant Health Progress*, jul. 2002. Disponível em: <https://www.apsnet.org/members/community/Pages/default.aspx>.

GRAHAM, H.; GOTTWALD, T. R.; CUBERO, J.; ACHOR, D. S. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Molecular Plant Pathology*, v. 5, n. 1, p. 1–15, jan. 2004. DOI: 10.1046/j.1364-3703.2004.00197.x.

GRAHAM, J. H. *et al.* Penetration through leaf stomata and growth of strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. *Phytopathology*, v. 82, n. 11, p. 1319-1325, 5 ago. 1992.

HE, S. Y. Type III protein secretion systems in plant and animal pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, v. 36, p. 363-392, 1998. DOI: 10.1146/annurev.phyto.36.1.363.

HE, Y.-W.; ZHANG, L.-H. Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 32, n. 5, p. 842–857, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00120.x>.

HOLM, L. Using Dali for protein structure comparison. *Methods in Molecular Biology*, v. 2112, p. 29–42, 2020. DOI: 10.1007/978-1-0716-0270-6_3.

HU, Y. *et al.* Lateral organ boundaries 1 is a disease susceptibility gene for citrus bacterial canker disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 111, n. 2, p. E521-E529, 2014. DOI: 10.1073/pnas.1313271111.

HUANG, C. H. *et al.* *Xanthomonas citri* subsp. *citri* requires a genus-specific outer membrane protein and TolB to coordinate cell membrane integrity and virulence. *Microbiology Spectrum*, v. 13, n. 2, 2021. DOI: 10.1128/spectrum.03455-21.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome Research*, v. 9, n. 9, p. 868-877, set. 1999. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.9.9.868>.

HUGUET, E. *et al.* *hpaA* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host specific hypersensitive reaction. *Molecular Microbiology*, v. 29, n. 6, p. 1379–1390, set. 1998. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.01019.x.

JACIANI, F. J.; DESTÉFANO, S. A. L.; RODRIGUES NETO, J.; BELASQUE, J. Detection of a new bacterium related to *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* infecting Swingle citrumelo in Brazil. *Plant Disease*, v. 93, n. 10, p. 1074, out. 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-93-10-1074b>.

JACQUES, M. A. *et al.* Using ecology, physiology, and genomics to understand host specificity in *Xanthomonas*. *Annual Review of Phytopathology*, v. 54, p. 163-187, 2016.

JIA, H. *et al.* Genome editing of the disease susceptibility gene *CsLOB1* in citrus confers resistance to citrus canker. *Plant Biotechnology Journal*, v. 15, p. 817–823, 2017. DOI: 10.1111/pbi.12677.

JIA, H.; OMAR, A. A.; ORBOVIĆ, V.; WANG, N. Biallelic editing of the *LOB1* promoter via CRISPR/Cas9 creates canker-resistant 'Duncan' grapefruit. *Phytopathology*, v. 112, n. 2, p. 308–314, 2022. DOI: 10.1094/PHYTO-04-21-0144-R.

JING, X. *et al.* The catalytic domain of the germination-specific lytic transglycosylase *SleB* from *Bacillus anthracis* displays a unique active site topology. *Proteins*, v. 80, n. 10, p. 2469–2475, out. 2012. DOI: 10.1002/prot.24140. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/prot.24140>. Acesso em: 11 jul. 2025.

JING, X.; FENG, Y. Site directed mutagenesis in *Phanerochaete chrysosporium* using homologous recombination. *Fungal Genetics and Biology*, v. 78, p. 50–58, 2015.

JONES, P. *et al.* InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, v. 30, n. 9, p. 1236–1240, 1 maio 2014. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu031. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu031>.

KALYAANAMOORTHY, S. *et al.* ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, v. 14, n. 6, p. 587–589, jun. 2017. DOI: 10.1038/nmeth.4285. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>.

KANIGA, K.; DELOR, I.; CORNELIS, G. R. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in Gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene*, v. 109, p. 137–141, 1991. DOI: 10.1016/0378-1119(91)90421-G.

KATZEN, F.; BECKER, A.; IELPMINI, M. V.; ODDO, C. G.; IELPI, L. New mobilizable vectors suitable for gene replacement in Gram-negative bacteria and their use in mapping of the 3' end of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum operon. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 1, p. 278–282, jan. 1999. DOI: 10.1128/AEM.65.1.278-282.

KILIAN, M. *et al.* Genetic manipulation of *Xanthomonas* spp.: development of an efficient allelic exchange system using pK18mobsacB. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 3, p. 785–793, 2011. DOI: 10.1128/AEM.01833-10.

LAIA, M. L. *et al.* New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. *BMC Microbiology*, v. 9, p. 12, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-12>.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. 1993. DOI: 10.1107/S0021889892009944.

LEE, T. K.; HUANG, K. C. The role of hydrolases in bacterial cell-wall growth. *Current Opinion in Microbiology*, v. 16, n. 6, p. 760–766, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.08.005>.

LEE, J.; LEE, H.-J.; SHIN, M.-K.; RYU, W.-S. Versatile PCR-mediated insertion or deletion mutagenesis. *BioTechniques*, v. 36, p. 398–400, 2004.

LEIGH, J. A.; COPLIN, D. L. Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annual Review of Microbiology*, v. 46, p. 307–346, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.46.100192.001515>.

LEITE JÚNIOR, R. P. *Cancro cítrico: prevenção e controle no Paraná*. Londrina: IAPAR, 1990. (Circular, 61).

LEITE JUNIOR, R. P.; MOHAM, S. K.; PEREIRA, A. L. G.; CAMPACCI, C. A. Controle integrado de cancro cítrico: efeito da resistência genética e da aplicação de bactericidas. *Fitopatologia Brasileira*, v. 12, p. 257–263, 1987.

LI, J.; WANG, N. Genome-wide mutagenesis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* reveals novel genetic determinants and regulation mechanisms of biofilm formation. *PLoS One*, v. 6, n. 7, e21804, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0021804.

LI, J.; WANG, N. Foliar application of biofilm formation-inhibiting compounds enhances control of citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Phytopathology*, v. 104, n. 2, p. 134–142, fev. 2014. DOI: 10.1094/PHYTO-04-13-0100-R.

LORENZONI, A. S. G.; DANTAS, G. C.; BERGSMA, T.; FERREIRA, H.; SCHEFFERS, D.-J. *Xanthomonas citri* MinC oscillates from pole to pole to ensure proper cell division and shape. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 1352, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01352.

MARTINS, T. Z. MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA DA ORF XAC0024 DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri* E SUAS IMPLICAÇÕES NO DESENVOLVIMENTO DO CANCRO CÍTRICO. 2016. 84 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Microbiologia Agropecuária, UNESP-FCAV, Jaboticabal, 2016.

MIELNICHUK, N. *et al.* Virulence factors analysis of native isolates of *Xanthomonas albilineans* and *Xanthomonas sacchari* from Tucumán, Argentina, reveals differences in pathogenic strategies. *Plant Pathology*, v. 70, p. 1072–1084, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.13367>.

MILLER, V. L.; MEKALANOS, J. J. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations. *Journal of Bacteriology*, v. 170, n. 2, p. 257–264, jan. 1988.

MITCHELL, A. M.; SILHAVY, T. J. Envelope stress responses: balancing damage repair and toxicity. *Nature Reviews Microbiology*, v. 17, n. 7, p. 417–428, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0199-0>.

MORÃO, L. G. Chalconas e curcuminoides como novas alternativas para combater o cancro cítrico e alguns patógenos de interesse clínico. 2018. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2018.

MOVAHEDEI, A. *et al.* Plant immunity is regulated by biological, genetic, and epigenetic factors. *Agronomy*, v. 12, n. 11, p. 2790, 2022. DOI: 10.3390/agronomy12112790.

NAQVI, S. A. H. *et al.* Citrus canker—distribution, taxonomy, epidemiology, disease cycle, pathogen biology, detection, and management: a critical review and future research agenda. *Plants*, Basel, v. 12, n. 3, p. 1–25, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants12030527>.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). NCBI – National Center for Biotechnology Information. Bethesda: U.S. National Library of Medicine, [s.d.]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

NGUYEN, L. T.; SCHMIDT, H. A.; VON HAESELER, A.; MINH, B. Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol.*, 2015 Jan;32(1):268–274. DOI: 10.1093/molbev/msu300.

NGUYEN, Q.-M.; ISWANTO, A. B. B.; SON, G. H.; KIM, S. H. Recent advances in effector-triggered immunity in plants: new pieces in the puzzle create a different paradigm. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, p. 4709, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22094709>.

NISHAD, R.; AHMED, T.; RAHMAN, J.; KAREEM, A. Modulation of plant defense system in response to microbial interactions. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 1298, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01298>.

OLIVEIRA, A. C. P.; *et al.* Transposons and pathogenicity in *Xanthomonas*: acquisition of murein lytic transglycosylases by TnXax1 enhances *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 virulence and fitness. *PeerJ*, v. 6, e6111, dez. 2018. DOI: 10.7717/peerj.6111.

OLIVEIRA NETO, O. B. *et al.* Site directed gene replacement of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Journal of Microbiological Methods*, v. 65, p. 171–179, 2006.

PDB: Protein Data Bank. *Protein data bank. Nature New Biology*, 1971, v. 233, p. 223.

PENA, M. M.; *et al.* mCherry fusions enable the subcellular localization of periplasmic and cytoplasmic proteins in *Xanthomonas* sp. *PLoS ONE*, v. 15, n. 7, e0236185, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0236185.

PENG, A.; *et al.* Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene CsLOB1 promoter in citrus. *Plant Biotechnology Journal*, v. 15, p. 1509–1519, 2017. DOI: 10.1111/pbi.12733.

PERRIER, A.; *et al.* Enhanced in planta fitness through adaptive mutations in EfpR, a dual regulator of virulence and metabolic functions in the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathogens*, v. 12, n. 12, e1006044, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006044>.

RIED, J. L.; COLLMER, A. Mutagenesis and mapping of *Erwinia chrysanthemi* virulence genes. *Journal of Bacteriology*, v. 169, n. 5, p. 2004–2010, maio 1987.

RISHEH, R. S.; VAZVANI, M. G.; TAHERI, A.; KENNEDY, J. F. Pectin-associated immune responses in plant-microbe interactions: a review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 273, part 2, p. 132790, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.132790>.

ROBÈNE, I.; *et al.* Development and comparative validation of genomic-driven PCR-based assays to detect *Xanthomonas citri* pv. *citri* in citrus plants. *BMC Microbiology*, v. 20, n. 1, p. 1–13, out. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-020-01972-8>.

SCHEURWATER, E.; REID, C. W.; CLARKE, A. J. Lytic transglycosylases: bacterial space-making autolysins. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 40, n. 4, p. 586–591, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.03.018>.

SCHNEIDER, D. J. *et al.* A recombination-based approach to construction of marker-free deletions in *Xanthomonas* spp. *Phytopathology*, v. 97, n. 5, p. 541–547, 2007. DOI: 10.1094/PHYTO-97-5-0541.

SCHUBERT, T. S.; *et al.* Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida—again. *Plant Disease*, v. 85, n. 4, p. 340–356, abril 2001. DOI: 10.1094/PDIS.2001.85.4.340.

SHAHBAZ, E. *et al.* Citrus canker pathogen, its mechanism of infection, eradication, and impacts. *Plants*, Basel, v. 12, n. 1, p. 123, 2022. DOI: 10.3390/plants12010123. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2223-7747/12/1/123>.

STUART, L. M.; PAQUETTE, N.; BOYER, L. Effector-triggered versus pattern-triggered immunity: how animals sense virulent pathogens. *Nature Reviews Immunology*, v. 13, n. 3, p. 199–206, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri3398>.

SUN, X.; *et al.* Detection and characterization of a new strain of citrus canker bacteria from Key/Mexican lime and Alemow in South Florida. *Plant Disease*, v. 88, n. 11, p. 1179–1188, nov. 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/pdis.2004.88.11.1179>.

TAZIMA, Z. H.; NEVES, C. S. V. J.; YADA, I. F. U.; LEITE JÚNIOR, R. P. Comportamento de clones de laranja ‘Valência’ na região norte do Paraná. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 30, n. 4, p. 970–974, 2008.

TAYI, L.; MAKU, R.; PATEL, H. K.; SONTI, R. V. Action of multiple cell wall-degrading enzymes is required for elicitation of innate immune responses during *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* infection in rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 29, n. 8, p. 599–610, 2016. DOI: 10.1094/MPMI-02-16-0039-R.

TEUFEL, F.; ALMAGRO ARMENTEROS, J. J.; JOHANSEN, A. R.; GÍSLASON, M. H.; PIHL, S. I.; TSIRIGOS, K. D.; WINTHER, O.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. *Nature Biotechnology*, v. 40, n. 7, p. 1023–1025, jul. 2022. DOI: 10.1038/s41587-021-01156-3.

TYPAS, A.; BANZHAF, M.; GROSS, C. A.; VOLLMER, W. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nature Reviews Microbiology*, v. 10, n. 2, p. 123–136, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2677>.

USDA. *Citrus: World Markets and Trade*, January 2025. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>. Acesso em: 7 set. 2025.

VAN SLUYS, M.-A. et al. Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, v. 40, n. 1, p. 169–189, set. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.030402.090559>.

VERNIÈRE, C.; HARTUNG, J. S.; PRUVOST, O. P.; CIVEROLO, E. L.; ALVAREZ, A. M.; MAESTRI, P.; LUISETTI, J. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. *European Journal of Plant Pathology*, v. 104, n. 5, p. 477–487, mar. 1998. DOI: <http://dx.doi.org/10.1023/a:1008676508688>.

VOLLAND, H.; KULAKAUSKAS, R.; DENIS, B.; ARNAUD, T.; GUÉRIN, J.; PERRIN, A. The Bacterial Cell Wall. *EcoSal Plus*, v. 9, n. 2, p. 1–47, 2020. DOI: 10.1128/ecosalplus.ESP-0010-2020. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11168573/pdf/ecosalplus.esp-0010-2020.pdf>.

VOLLMER, W.; BLANOT, D.; DE PEDRO, M. A. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 32, n. 2, p. 149–167, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x>.

VUONG, C.; KOCIANOVA, S.; VOYICH, J. M.; YAO, Y.; FISCHER, E. R.; DELEO, F. R.; OTTO, M. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 52, p. 54881–54886, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M411374200>.

WANG, Helen; JOFFRÉ, Enrique. Plasmid copy number as a modulator in bacterial pathogenesis and antibiotic resistance. *NPJ Antimicrobial Resistance*, [S.l.], v. 3, p. 72, 18 ago. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1038/s44259-025-00145-9>.

WENGELNIK, K.; BONAS, U. HpaI, a new protein of the hypersensitive response and pathogenicity (hrp) gene cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, is secreted via the Hrp type III pathway. *Journal of Bacteriology*, v. 178, n. 1, p. 106–116, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.178.1.106-116.1996>.

WENGELNIK, K.; MARIE, C.; RUSSEL, M.; BONAS, U. Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. *Journal of Bacteriology*, v. 178, p. 1064–1069, 1996b.

WEST, L.; YANG, D.; STEPHENS, C. Use of the *Caulobacter crescentus* genome sequence to develop a method for systematic genetic mapping. *Journal of Bacteriology*, v. 184, n. 8, p. 2155–2166, 15 abr. 2002.

WU, L. *et al.* *Xanthomonas citri* subsp. *citri* requires a genus-specific outer membrane protein and TolB to coordinate cell membrane integrity and virulence. *Microbiology Spectrum*, v. 13, n. 2, 16 jan. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/spectrum.02521-24>.

YAN, Q.; WANG, N. High-throughput screening and analysis of genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in citrus canker symptom development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 25, n. 1, p. 69–84, jan. 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/mpmi-05-11-0121>.

YUN, M. H. *et al.* Xanthan induces plant susceptibility by suppressing callose deposition. *Plant Physiology*, v. 141, n. 1, p. 178–187, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.105.074542>.

ZHAO, Q. *et al.* Diffusible signal factor primes plant immunity against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) via JA signaling in *Arabidopsis* and *Brassica oleracea*. *Molecular Plant Pathology*, v. 20, n. 11, p. 1574–1588, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.12855>.