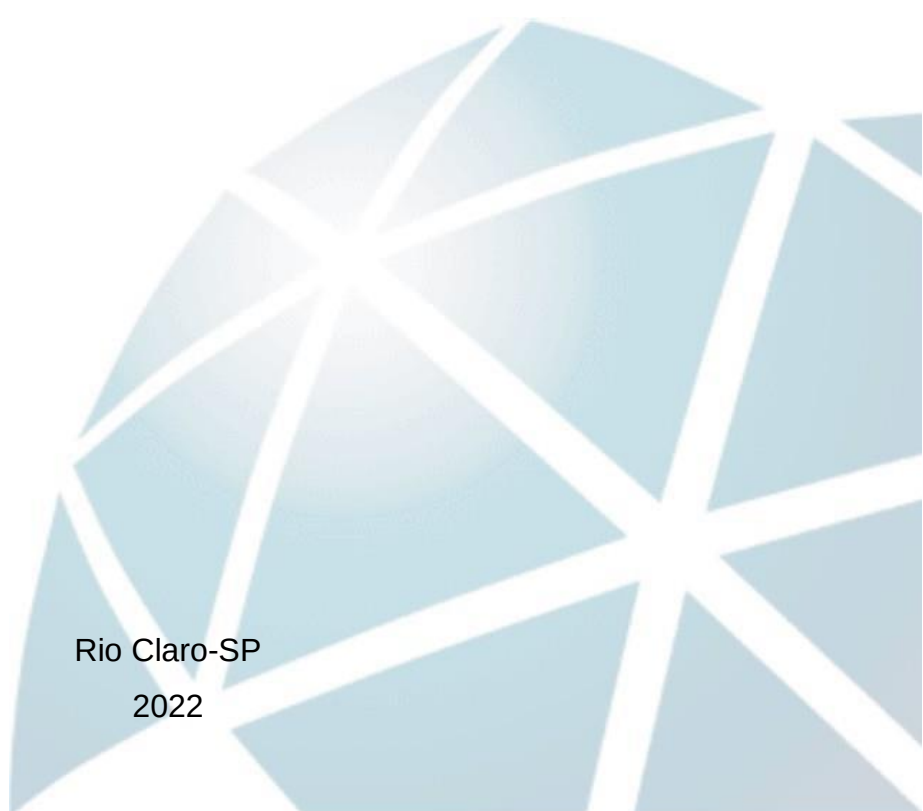

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GIOVANA BETIN PERUCHI

**RELAÇÃO ENTRE O ESTRESSE OXIDATIVO E A
RESPOSTA DE DEFESA VEGETAL EM LARANJA DOCE
(*CITRUS SINENSIS*) APÓS PULVERIZAÇÃO COM
COBRE**

Rio Claro-SP

2022



GIOVANA BETIN PERUCHI

**RELAÇÃO ENTRE O ESTRESSE OXIDATIVO E A RESPOSTA DE
DEFESA VEGETAL EM LARANJA DOCE (*CITRUS SINENSIS*) APÓS
PULVERIZAÇÃO COM COBRE**

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

Orientadora: Alessandra Alves de Souza

Corientador: Prof. Dr. Gustavo Habermann

Rio Claro-SP

2022

P471r	Peruchi, Giovana Betin Relação entre estresse oxidativo e a resposta de defesa vegetal em laranja doce (<i>Citrus sinensis</i>) após pulverização com cobre / GiovanaBetin Peruchi. -- Rio Claro, 2022 41 p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado e licenciatura - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro Orientadora: Alessandra Alves de Souza Coorientador: Gustavo Habermann 1. Fitopatologia. 2. Laranja Doenças e pragas. 3. Estresse oxidativo. 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

GIOVANA BETIN PERUCHI

**RELAÇÃO ENTRE O ESTRESSE OXIDATIVO E A RESPOSTA DE DEFESA
VEGETAL EM LARANJA DOCE (*CITRUS SINENSIS*) APÓS PULVERIZAÇÃO
COM COBRE**

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
para obtenção do grau de Bacharela e Licenciada em Ciências
Biológicas.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Alessandra Alves de Souza

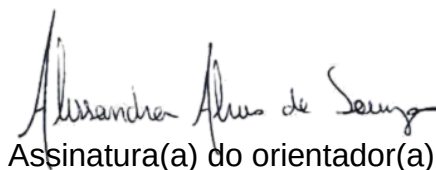
Prof. Dr. Gustavo Habermann

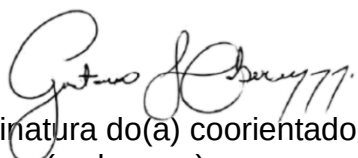
Prof. Dr. Douglas Domingues

Prof. Dr. Marina Gavassi

Aprovado em: 06 de agosto de 2022


Assinatura do discente


Assinatura(a) do orientador(a)


Assinatura do(a) coorientador(a)
(se houver)

Assinatura do(a) supervisor(a)
(se houver)

Dedico este trabalho aos meus pais
Andresa e Marcos, que sempre me
incentivaram e acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a minha família, meu pai Marcos, minha mãe Andresa e ao meu irmão Pedro, por todo o apoio, dedicação, amor e companheirismo. Vocês são minha fortaleza e me ensinaram a acreditar na minha capacidade de chegar até aqui.

A minha orientadora Alessandra, pela oportunidade, por todo aprendizado, ensinamento, conhecimento compartilhado e por sempre me incentivar a crescer.

A professora Marina Gavassi, pelo auxílio na elaboração e correção deste trabalho e ao meu coorientador Gustavo Habermann, pela oportunidade.

Ao Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” pela infraestrutura oferecida, pela oportunidade de realizar este trabalho e a todas as amigas lá conquistadas. Eduarda, Isis e Reinaldo, que sempre estavam prontos a me ajudar e aconselhar no laboratório e fora dele. A Maju por toda ajuda com as análises deste trabalho. A Nathalia por todas as caronas e idas ao campo. A Paula e a Simone por todos os ensinamentos e colaboração neste trabalho.

A UNESP Rio Claro por proporcionar essa experiência, por todos os conhecimentos adquiridos nas disciplinas e a todas as pessoas que eu conheci lá.

A minha segunda família, Pitayas (Evi, Ian, Duda, Vany, Kakau e Inaê), que me acolheram em Rio Claro e estiveram comigo durante toda a graduação. Agradeço por todos os momentos, por sempre me apoiar, por todas as viagens de campo, idas à praia, rolês, aulas. Com vocês tudo ficou mais leve!

Aos meus grandes companheiros Gabi e Rodolfo, que também sempre estiveram ao meu lado.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte de minha formação, meu muitíssimo obrigada!

RESUMO

O método adotado controle do cancro cítrico, doença bacteriana que afeta todas as espécies de citros e causa grandes prejuízos ao agronegócio brasileiro, consiste na pulverização de compostos a base de cobre e devido a insolubilidade desses compostos, seu uso é estritamente preventivo. Apesar de ser um micronutriente essencial para as plantas, o cobre pode apresentar potencial tóxico, decorrente do aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Sabe-se que o estresse oxidativo decorrente do acúmulo de ROS, pode perturbar inúmeros mecanismos básicos fisiológicos e bioquímicos das plantas. Trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa, mostraram que o uso do cobre de forma curativa (aplicado após a presença da bactéria) pode aumentar a severidade da doença. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi investigar se o estresse oxidativo causado pelo cobre está relacionado a alterações na resposta de defesa vegetal e o aumento da severidade. Para tanto, inicialmente avaliamos tratamentos curativo e preventivo para o cancro cítrico com oxiclreto de cobre em plantas de *Citrus sinensis*. As plantas tratadas de forma curativa apresentaram aumento significativo de sintomas, não modulação do gene *PR1*, e repressão dos genes *CuZnSOD* e *GST*. Com base nesses resultados, um segundo experimento foi realizado, visando avaliar os efeitos do oxiclreto de cobre na ausência da bactéria. Os resultados obtidos mostraram considerável repressão do gene *PR1* na presença do cobre. O teor de H_2O_2 aumentou significativamente, e atividade das enzimas antioxidantes no geral diminuiu, indicando que a presença do cobre ocasionou em um desequilíbrio na detoxificação de ROS. Com base neste trabalho, sugere-se que o fenótipo de sintomas mais severos observado no tratamento curativo, ocorre devido ao aumento do nível de estresse na planta, causado inicialmente pela bactéria e potencializado pela presença do cobre. Esse aumento, pode estar de alguma forma acarretando a diminuição do mecanismo de defesa vegetal, favorecendo, conseqüentemente a colonização bacteriana e sintomatologia.

Palavras- chave: citricultura, cancro cítrico; oxiclreto de cobre; ROS.

ABSTRACT

Citrus canker is caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, which affect all citrus species and cause huge losses to Brazilian agribusiness. The method adopted for its compound control consists of spraying a copper base. Due to the insolubility of these compounds, their use is strictly preventive. Even though being an essential micronutrient for plants, copper can have been toxic, because of the increase in the production of reactive oxygen species (ROS). It is known that oxidative stress resulting from the accumulation of ROS can disturb the physiological and biochemical mechanisms of plants. Previous works by our research group showed that the use of copper in a curative way (applied after the presence of the bacteria) can increase the severity of the disease. Thus, the objective of this work was to investigate whether the oxidative stress caused by copper is related to changes in the plant defense response and the increase in severity. Therefore, we initially evaluated curative and preventive treatments for citrus canker with copper oxychloride in *Citrus sinensis* plants. The curatively treated plants showed a significant increase in symptoms, non-modulation of the *PR1* gene, and repression of the *CuZnSOD* and *GST* genes. Based on these results, a second experiment was carried out to evaluate the effects of copper oxychloride in the absence of the bacteria. The results obtained showed considerable repression of the *PR1* gene in the presence of copper. The H_2O_2 content increased significantly, and the activity of antioxidant enzymes in general decreased, indicating that the presence of copper caused an imbalance in the detoxification of ROS, occurs due to the increase in the stress level in the plant, initially caused by the bacteria and potentiated by the presence of copper. This increase may somehow be causing a decrease in the plant defense mechanism, consequently favoring bacterial colonization and symptoms.

Keywords: citrus, citrus canker; copper oxychloride; ROS.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	8
1.1.	A citricultura brasileira	8
1.2.	Cancro cítrico	8
1.3.	Controle do cancro cítrico.....	9
1.4.	Os efeitos do cobre na planta	11
1.5.	Objetivos.....	12
2.	MATERIAS E MÉTODOS	12
2.1.	Experimento 1 - Ensaio com cobre e <i>Xanthomonas citri</i>	12
2.1.1.	<i>Análise de sintomas</i>	12
2.1.2.	<i>Expressão gênica.....</i>	12
2.2.	Experimento 2 - Ensaio apenas com cobre	15
2.2.1.	<i>Expressão gênica.....</i>	15
2.2.2.	<i>Quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)</i>	16
2.2.3.	<i>Extração de proteínas totais.....</i>	17
2.2.4.	<i>Determinação da atividade de Superóxido dismutase (SOD)</i>	17
2.2.5.	<i>Determinação da atividade de catalase (CAT).....</i>	17
2.2.6.	<i>Determinação da atividade de ascorbato peroxidase (APX)</i>	18
3.	RESULTADOS	18
3.1.	Experimento 1 - ensaio com X. citri.....	18
3.1.1.	<i>Análise de sintomas</i>	18
3.1.2.	<i>Análise de expressão gênica</i>	19
3.2.	Experimento 2 – Ensaio somente com cobre	22
3.2.1.	<i>Análise de expressão gênica</i>	22
3.2.2.	<i>Quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)</i>	25
3.2.3.	<i>Extração de proteínas</i>	25
3.2.4.	<i>Determinação da atividade de Superóxido dismutase (SOD)</i>	26
3.2.5.	<i>Determinação da atividade de catalase (CAT).....</i>	27
3.2.6.	<i>Determinação da atividade de ascorbato peroxidase (APX)</i>	28
4.	DISCUSSÃO.....	28
4.1.	Experimento 1 – Ensaio com cobre e X. citri.....	28
4.2.	Experimento 2 – Ensaio com cobre.....	29
5.	CONCLUSÃO	32

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Citricultura brasileira

A laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) é um dos principais produtos do agronegócio brasileiro (FAO, 2020). O Brasil é responsável pela produção de 79% de todo o suco de laranja consumido no mundo (CITRUSBR, 2022), o que contribui para o desenvolvimento social do país, gerando empregos diretos e indiretos em diversos estados brasileiros. Dentre as regiões produtoras do Brasil, destaca-se o cinturão citrícola, onde se localiza a maior concentração de propriedades que se dedicam à produção comercial de laranja, abrangendo municípios do estado de São Paulo e alguns situados nas regiões do Triângulo Mineiro e Sudoeste de Minas Gerais. (FUNDECITRUS, 2022). Segundo o inventário de estimativa de árvores do cinturão citrícola atualizado em março de 2021, a região foi responsável por aproximadamente 80% de toda laranja doce produzida no país, ocupando uma área de aproximadamente 387.169 hectares, localizadas em 347 municípios (FUNDECITRUS, 2021).

Apesar da alta produção, de acordo com a reestimativa de safra 2021/22 do cinturão citrícola, a última safra apresentou resultado 10,61% menor do que o estimado, devido a condições climáticas atípicas e a elevada taxa de queda de frutos, causada majoritariamente por pragas e doenças (FUNDECITRUS, 2022). Dentre elas, destaca-se o cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

1.2. Cancro cítrico

A bactéria *X. citri* é disseminada de uma planta para outra através de chuvas e vento, sendo que uma vez na folha a bactéria se multiplica na superfície formando biofilmes (RIGANO *et al.*, 2007); concomitantemente ela entra naturalmente em seus hospedeiros através de aberturas naturais tal como estômatos e através de ferimentos (BRUNINGS & GABRIEL, 2003). Uma vez dentro do hospedeiro a bactéria utiliza do seu sistema de secreção do tipo III (T3SS), que é essencial para a virulência da bactéria (LAIA *et al.*, 2009), para injetar efetores dentro das células parenquimáticas do mesófilo da folha (BRUNINGS & GABRIEL, 2003). Esses efetores desativam a expressão de genes de defesa das plantas associados a imunidade inata (PTI) e ativam a expressão de alguns genes da planta para melhor adaptação da bactéria no ambiente do hospedeiro (JONES E DANGL, 2006; DALIO *et al.*, 2017). Os efetores podem tanto facilitar a infecção quanto desencadear respostas de defesa do hospedeiro. A resposta de defesa desencadeada pelos efetores (ETI) é baseada

na interação altamente específica entre de genes de avirulência de patógenos e genes de resistência do hospedeiro (R) que codificam proteínas R. As proteínas R podem reconhecer efetores de patógenos direta ou indiretamente por meio de seus efeitos nas células hospedeiras (DALIO, *et al.* 2017, WIN, *et al.*, 2012). As respostas ETI estão associadas à especificidade da molécula efetora sintetizada por determinada linhagem do patógeno, havendo normalmente o desencadeamento de respostas de hipersensibilidade e de resistência sistêmica adquirida por parte do hospedeiro (THOMMA *et al.*, 2011). Quando o hospedeiro é suscetível ao patógeno, seus genes são alvo de efetores de virulência, e a suscetibilidade por efetores (ETS) é desencadeada, permitindo o desenvolvimento da doença (DALIO, *et al.* 2017).

1.3. Controle do cancro cítrico

O cancro afeta todos os pomares do mundo, podendo ocasionar desfolha e queda de frutos em árvores severamente afetadas, além de restringir o uso dos cultivares suscetíveis a doença (GOTTWALD *et al.*, 2001, 2002; BEHLAU *et al.*, 2008). Segundo o último levantamento anual da incidência das doenças dos citros realizado pela Fundecitrus, ocorreu um aumento gradativo da doença no período de 2017 a 2020 (Figura 1). No ano de 2021 a incidência diminuiu, porém, a taxa de queda de frutos se manteve estável quando comparado a safra anterior (FUNDECITRUS, 2021). A menor prevalência do cancro cítrico nos pomares nos últimos meses não indica a ausência da doença, pois provavelmente, o cancro cítrico continua presente nas propriedades anteriormente identificadas. Dessa forma, se o pomar não estiver adequadamente protegido novas infecções podem ocorrer, principalmente na época das chuvas (FUNDECITRUS, 2021).

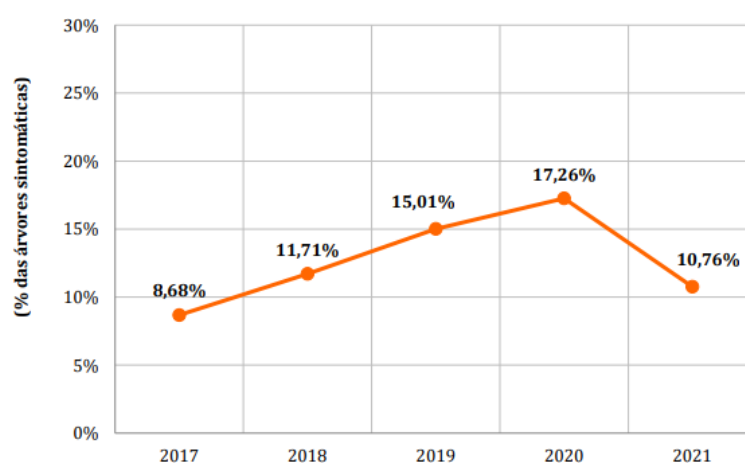


Figura 1. Percentual das árvores de laranja com incidência de sintomas de cancro cítrico. Fonte: Fundecitrus, 2021. Levantamento da incidência das doenças de citros. p. 72.

O procedimento determinado pela Constituição Federal para erradicação do cancro cítrico em talhões comerciais, consiste na eliminação da planta foco e pulverização de calda cúprica na concentração de um décimo percentual de cobre metálico em todas as plantas cítricas no raio de trinta metros, a partir da planta diagnosticada contaminada (BRASIL, 2018). Os compostos a base de cobre comumente utilizados são hidróxido de cobre, oxicleto de cobre e óxido cuproso, os quais apresentam cobre de forma fixa ou insolúvel (HIPPLER *et al.*, 2017). De acordo com o aumento da incidência do cancro cítrico apresentado na Figura 1, entende-se que a aplicação do cobre não tem sido eficiente para conter o avanço da doença. Devido à baixa solubilidade desses compostos, a liberação dos íons de cobre ocorre lentamente, e não apresentam atividade curativa ou sistêmica, sendo estritamente preventivos (BEHLAU *et al.*, 2010; SCAPIN, *et al.*, 2015).

Visando um manejo mais adequado e sustentável, foram avaliados tanto a aplicação recomendada como preventivo, como também de o uso de cobre de forma curativa para verificar como seria o efeito do cobre quando a bactéria já estivesse na planta, pois muitas vezes em condições de campo o cobre é aplicado na planta que ainda está assintomática, mas com a presença da bactéria. Trabalhos prévios realizados durante o projeto de iniciação científica (FAPESP 2017/25520-8), revelaram que, o uso do cobre de forma curativa nas doses recomendadas, acarretou o aumento significativo da severidade do cancro cítrico (Figura 2). Tais resultados indicam que o uso do cobre de forma curativa, pode estar relacionado ao aumento a suscetibilidade a essa doença.

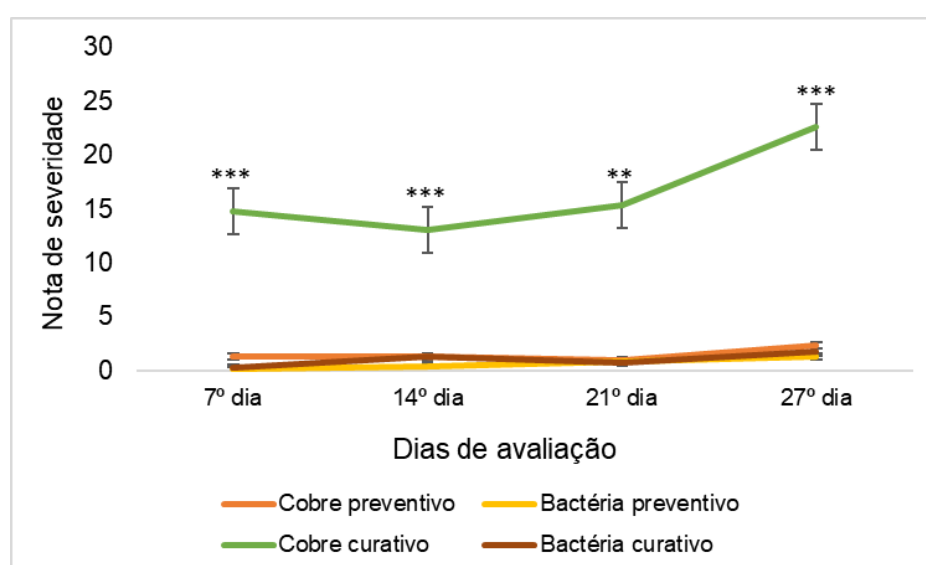


Figura 2. Média da severidade dos sintomas do cancro cítrico referentes a 5 plantas individuais cuja nota foi atribuída por três avaliadores independentes, seguindo a escala diagramática para cancro cítrico (Belasque *et al.*, 2005). Asteriscos representam diferença significativa através do teste *t* de Student, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

1.4. Os efeitos do cobre na planta

Apesar de ser um micronutriente essencial, o cobre quando em excesso, apresenta potencial tóxico, podendo comprometer inúmeros processos fisiológicos e bioquímicos das plantas, como inibição do crescimento, alteração na conformação de proteínas, alteração no fluxo de íons, danos ao aparato fotossintético e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (YRUELA, 2005; CAMBROLLÉ *et al.*, 2013; HIPPLER *et al.*, 2017). O aumento de ROS pode ser considerado um efeito direto em resposta a aplicação do cobre, o qual varia de acordo com a espécie de planta e a concentração do cobre aplicado (ADRESS *et al.*, 2015). O acúmulo de ROS pode causar sérios danos a componentes celulares como membranas, proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e pigmentos do cloroplasto, prejudicando o metabolismo vegetal (MITTLER, 2002; EMAMVERDIAN, *et al.*, 2015).

Para evitar o acúmulo dessas espécies reativas, as plantas dispõem de mecanismos para eliminá-los, podendo ser enzimático ou não enzimático. Dentre os principais metabólitos antioxidantes não enzimáticos, encontram-se o ácido ascórbico, a glutathione (GSH) o α -tocoferol e os carotenoides. Nas plantas, o aumento na concentração dessas moléculas pode indicar um aumento na tolerância ao estresse por metais (DIETZ *et al.*, 1999). O mecanismo enzimático é composto por enzimas antioxidantes. A primeira enzima que atua no processo de detoxificação é a superóxido dismutase (SOD), responsável pela dismutação de superóxidos ($O_2^{\cdot -}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular. A SOD apresenta três diferentes isoformas, sendo a dependente de cobre e zinco (Cu/Zn - SOD) a mais abundante delas, tendo o cloroplasto como local de ação (KANEMATSU & ASADA, 1990). O peróxido de hidrogênio, produto da ação das SODs, é menos reativo e mais estável que os superóxidos, porém ainda é considerado uma ROS (ALSCHER & HESS, 1993).

O mecanismo de detoxificação de H_2O_2 é composto por enzimas peroxidases, como a catalase (CAT) e a ascorbato peroxidase (APX) que acarretam a produção de água e oxigênio molecular. De acordo com Mittler (2002), a CAT tem uma afinidade para o H_2O_2 para valores da ordem de micromolar, enquanto a APX atua na ordem dos milimolares, indicando uma função celular diferente de ambas as enzimas. A catalase está muito mais relacionada com a eliminação do H_2O_2 em excesso, enquanto a APX pode estar associada a uma função de sinalização e regulação do excesso de H_2O_2 (MITTLER, 2002).

Portanto, a presença do cobre pode ocasionar um desbalanço nas enzimas detoxificantes, uma vez que por meio da reação de Fenton, o ciclo redox entre Cu^{2+} e Cu^+ catalisa a produção de radicais $OH^{\cdot}$ provenientes de radicais $O_2^{\cdot -}$ e de H_2O_2 , (BRIAT e LEBRUN, 1999). A hidroxila ($OH^{\cdot}$) é a ROS mais instável e com maior potencial reativo, e

não há sistema enzimático capaz de detoxificá-la. Por isso a manutenção do equilíbrio das enzimas é de extrema importância (BARBOSA, *et al.*, 2010).

Com base nos resultados preliminares indicando o aumento de severidade do cancro cítrico quando o cobre é utilizado de forma curativa, e nos efeitos tóxicos que o cobre pode apresentar; a hipótese desse trabalho é que o estresse oxidativo possivelmente causado pela pulverização do cobre está relacionado com a diminuição da defesa vegetal em plantas jovens de laranja doce.

1.5. Objetivos

- Avaliar a sintomatologia e progressão do cancro cítrico após tratamento preventivo e curativo com 0,1% de oxicloreto de cobre em casa de vegetação;
- Verificar a relação entre a intensidade da doença e os tratamentos com cobre através da análise de expressão de genes associados à defesa e ao estresse oxidativo;
- Avaliar a expressão dos genes associados ao mecanismo de defesa e estresse oxidativo na presença do cobre e ausência da bactéria;
- Avaliar estresse oxidativo em laranja doce na presença do cobre, através da quantificação de peróxido de hidrogênio e determinação da atividade de enzimas antioxidantes;
- Relacionar a avaliação de estresse oxidativo com os a análise de expressão dos genes envolvidos no mecanismo de defesa vegetal;

2. MATERIAS E MÉTODOS

2.1. Experimento 1 - Ensaio com cobre e *Xanthomonas citri*

Para início do experimento foram necessárias à obtenção de 12 mudas de laranja doce da variedade valência, as quais foram enxertadas em limão cravo previamente plantados em vasos de 4,5 L contendo substrato de fibra de coco. As mudas foram mantidas em casa de vegetação no Centro de Citricultura Sylvio Moreira em Cordeirópolis – SP, com temperatura controlada de 28 °C e submetidas ao sistema de irrigação até aproximadamente 5 semanas após o início de brotações, tamanho ideal para início do experimento. Após esse período, as plantas foram transportadas até a casa de vegetação localizada na UNESP – Campus de Rio Claro, onde foram mantidas nas condições anteriores. Quatro tratamentos foram realizados com três réplicas biológicas cada. Sendo 1) Tratamento curativo, 2) Controle curativo, 3) Tratamento preventivo e 4) Controle preventivo. Para todos os tratamentos, um inóculo de X.

citri foi preparado em 100 mL de meio NBY e mantido sob agitação a 180 rpm e 28°C, por aproximadamente 16 h, até atingir $DO_{600} = 1,7$. Em seguida, a cultura crescida foi acrescentada em 900 mL de água de torneira autoclavada. Para o tratamento curativo (1), inicialmente a solução contendo *X. citri* foi pulverizada e após 24h, uma solução contendo 100 µg/mL de oxicloreto de cobre (Difere) e 0,02 % de adjuvante Silwet-I77 foi aplicada. Para o tratamento preventivo (3), a solução contendo cobre foi aplicada primeiro e após 24h a solução de bactéria foi pulverizada. As plantas mantidas como controle (Tratamentos 2 e 4) passaram pelo mesmo processo, porém a solução de cobre foi substituída por água de torneira autoclavada. Aproximadamente 50mL de cada solução foram pulverizadas durante toda extensão das folhas e caules, as quais foram aplicadas com bombas de pulverização com capacidade de 1,5 L. Passado 24 h após as aplicações, amostras foliares foram coletadas, imediatamente imersas em N₂ líquido e transportadas ao laboratório para posterior extração de RNA total e análise de expressão gênica.

2.1.1. Análise de sintomas

A progressão dos sintomas foi avaliada a cada 7 dias de acordo com a escala diagramática para avaliação de cancro cítrico (Figura 3) durante 21 dias. Foram atribuídas notas para cada folha de cada planta, e ao final de cada avaliação, as médias de cada planta e de cada tratamento foram calculadas.

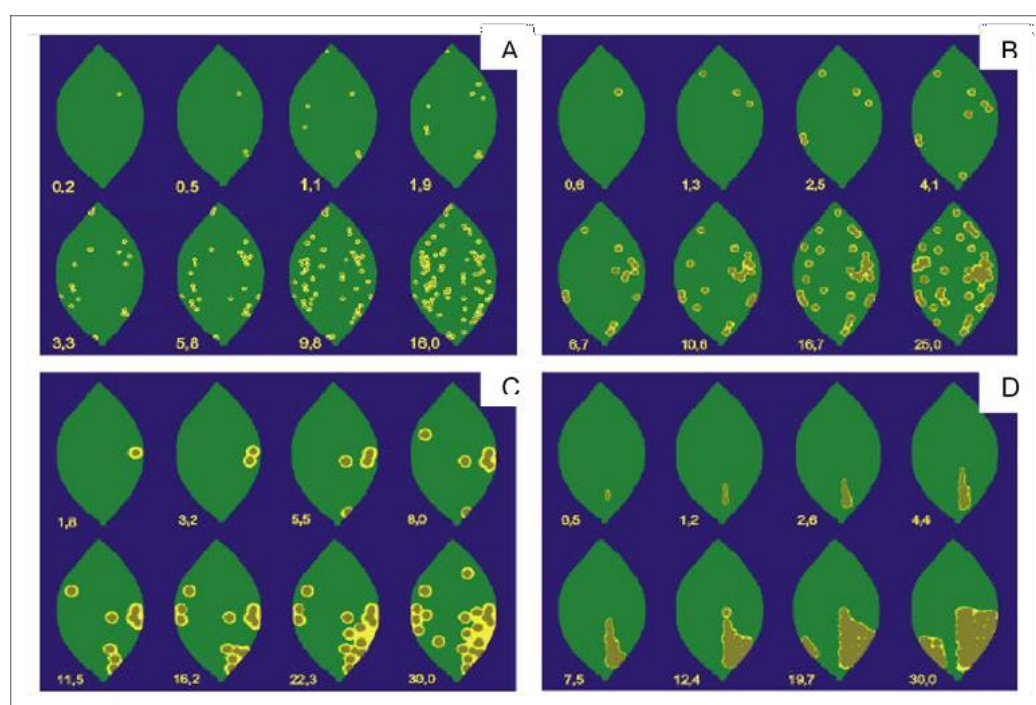


Figura 3. Escala diagramática para avaliação de severidade (%) de cancro cítrico em folhas para lesões pequenas (A), médias (B), grandes (C) e associadas com o ataque de larva minadora de citros (D). BELASQUE, et al.,2005)

2.1.2. Expressão gênica

Para avaliar se a presença do cobre altera a expressão de genes associados a defesa primária das plantas e ao estresse oxidativo, foi realizada a extração de RNA total das folhas coletadas através do método de Trizol (Invitrogen) seguindo as especificações do fabricante. As amostras obtidas foram quantificadas em espectrofotômetro 600 nm (Nanodrop 8000 – Thermo Fisher Scientifics) e para verificar a integridade do RNA as amostras foram aplicadas a eletroforese em um gel de agarose 1%. Confirmada a qualidade e integridade das amostras, estas foram tratadas com DNase (RQ1 Promega). Após o tratamento, uma PCR convencional foi realizada para verificar a possível presença de contaminação por DNA. Confirmada a ausência de DNA contaminante, o cDNA foi sintetizado através do kit GoScript Reverse Transcription (Promega). A partir do cDNA obtido, a análise da expressão do gene codificador da proteína relacionada a patogênese 1 (*PR1* – pathogenesis-related protein 1) associado a defesa contra patógenos, e dos genes codificadores da cobre-zinco superóxido dismutase (*Cu-Zn SOD*) e Glutathione-S-transferase1 (*GST1*), associados ao estresse oxidativo foi realizada via RT-qPCR. Para tal, foram utilizados o mix GoTaq (Promega), o equipamento QuantStudio3 (Applied Biosystem) e o gene codificador da ubiquitina como normalizador.

Para normalização, o número de cópias (ct) do gene alvo foi subtraído do ct do gene endógeno da mesma amostra, obtendo o Δct . Após a normalização, as amostras foram calibradas a partir da subtração do Δct do tratamento com cobre do Δct do tratamento controle, obtendo o $\Delta\Delta ct$. Por fim o fold change foi calculado através da equação: $2^{-\Delta\Delta ct}$. Valores menores que 1 indicam repressão do gene e valores maiores que 1 indicam indução. A sequência dos primers utilizados está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência de primers utilizados para expressão gênica no ensaio com *X. citri*

Gene	Sequência dos primers	Referência
Ubiquitina	F: TTC GTC AGT TGA CTA ATC CT	Shi <i>et al.</i> , 2014
	R: GTT GCT GTG TTG ACT GTG	
PR1	F: AAGGAAAGCGGATTGCAAAC	Shi <i>et al.</i> , 2014
	R: CTCGCCAAGCTTGAAATTGTC	
GST1	F: GCCCGTTTGTCTCACTCCAA	Shi <i>et al.</i> , 2014
	R: TGCAAATCGACCAAGGTGAA	
CuZnSODchl	F: ACACACTCCTTGCCACATTG	Bergamo, 2019
	R: TGAGACGAGAGGGGAATTTG	

2.2. Experimento 2 - Ensaio apenas com cobre

Baseado nos resultados obtidos no experimento 1, o experimento 2 foi elaborado a fim de avaliar os efeitos do cobre no sistema de defesa na ausência da bactéria. Para início do experimento foram necessárias à obtenção de 10 mudas de laranja doce da variedade valência, as quais foram enxertadas em limão cravo previamente plantados em vasos de 4,5 L contendo substrato de fibra de coco. As mudas foram mantidas em casa de vegetação no Centro de Citricultura Sylvio Moreira em Cordeirópolis – SP, com temperatura controlada de 28 °C e submetidas ao sistema de irrigação. Após aproximadamente 5 semanas após brotação, as plantas foram pulverizadas com oxicloreto de cobre (Difere) na concentração de 100 µg/mL de cobre metálico, contendo 0,02% do adjuvante comercial Silwet- I77 para que ocorresse maior adesão do composto nas folhas. Dois tratamentos foram realizados com 5 plantas cada, sendo: 1) Controle 2 - Silwet-I77 0,02% e 2) Tratamento Cobre com Silwet-I77 0,02%. Para aplicação foram utilizadas bombas de pulverização com capacidade de 1,5 L. Aproximadamente 50mL de calda cúprica foram pulverizadas durante toda extensão das folhas e caules. Após esse processo duas coletas foram realizadas, 24h e 48h após a pulverização, em cada uma delas cinco folhas de cada planta foram coletadas, imediatamente imersas em N₂ líquido, transportadas ao laboratório e armazenadas no freezer -80 °C para posterior extração de RNA e proteínas.

2.2.1. Expressão gênica

As folhas coletadas foram maceradas em N2 líquido e o RNA total foi extraído através do método de Trizol (Invitrogen) seguindo as especificações do fabricante. As amostras obtidas foram quantificadas em espectrofotômetro 600 nm (Nanodrop 8000 - Thermo Fisher Scientifics) e para verificar a integridade do RNA as amostras foram aplicadas a eletroforese em um gel de agarose 1%. Confirmada a qualidade e integridade das amostras, estas foram tratadas com DNase (RQ1 Promega) seguindo as especificações do fabricante. Após o tratamento, uma PCR convencional foi realizada para verificar a possível presença de contaminação por DNA. Confirmada a ausência de DNA contaminante, o cDNA foi sintetizado através do kit GoScript Reverse Transcription (Promega). Por fim, as análises de expressão dos genes foram realizadas via RT-qPCR, utilizando o mix GoTaq (Promega) e o equipamento QuantStudio3 (Applied Biosystem). O gene codificador da ubiquitina foi utilizado como normalizador, e a sequência dos primers utilizados estão contidos na tabela 2. A fim de melhor avaliar o sistema de defesa vegetal e estresse oxidativo frente a pulverização com cobre, além dos genes utilizados no experimento 1 (Tabela 1), a expressão dos genes *EDS1*, *SGT1* e *APXchl* também foram avaliadas neste ensaio. O cálculo da expressão dos genes foi calculada seguindo a metodologia apresentada no item 2.1.2.

Tabela 2. Sequência de primers utilizados para expressão gênica no ensaio com cobre

Gene	Sequência dos primers	Referência
Ubiquitina	F: TTC GTC AGT TGA CTA ATC CT R: GTT GCT GTG TTG ACT GTG	Shi <i>et al.</i> , 2014
<i>PR1</i>	F. AAGGAAAGCGGATTGCAAAC R: CTCGCCAAGCTTGAAATTGTC	Shi <i>et al.</i> , 2014
<i>EDS1</i>	F: GGCTCGAGTATGCCCTGAAG R: CTTGCCCAGAAACATGATTCC	Shi <i>et al.</i> , 2014
<i>SGT1</i>	F: AGGATGTTGAGACAGTGATGG R: CTTCTCAGGCTTCTGGTAAA	Mitre, <i>et al.</i> , 2021
<i>GST1</i>	F: GCCCGTTTGTCTCACTCCAA R: TGCAAATCGACCAAGGTGAA	Shi <i>et al.</i> , 2014
<i>APXchl</i>	F: ATTCGTCCGGAAAGAGTGAG R: TTCCACCAACGGCTTCATAC	Bergamo, 2019
<i>CuZnSODchl</i>	F: ACACACTCCTTGCCACATTG R: TGAGACGAGAGGGGAATTTG	Bergamo, 2019

2.2.2. Quantificação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Para avaliar se a presença do cobre causou estresse oxidativo, a concentração de H_2O_2 foi quantificado segundo protocolo de Alexieva *et al* (2001). Para tal, 0,25 g de amostras frescas coletadas foram maceradas em um cadinho com N_2 líquido, em seguida foram homogeneizadas com 2,5 mL de TCA 0,1% (0,1 g de TCA/ L de dH_2O). As amostras foram transferidas para tubos de 2 mL e centrifugadas a 10.000 rpm por 15 min, a 4°C. Após a centrifugação, 200 μ L foram retirados do sobrenadante e passados para um novo tubo, onde foram adicionados 200 μ L de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 800 μ L de solução 1 M de iodeto de potássio. Os tubos foram mantidos no gelo e no escuro durante uma hora. Passado este período, as amostras foram retiradas do gelo e permaneceram no escuro por 20 min, para que a reação fosse estabilizada. Por fim, a leitura foi realizada por fotometria a 390 nm e a concentração de H_2O_2 obtida foi expressa em μ mol/g de tecido fresco. Para realização da reta de calibração, inicialmente uma solução foi preparada contendo 0,1 mL de H_2O_2 e 10 mL de água destilada. 50 μ L dessa solução foi diluída em 1 mL de Tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), e a partir dessa solução os pontos da curva foram montados.

2.2.3. Extração de proteínas totais

Para a extração enzimática total, 0,3 g do material vegetal congelado foi macerado em N_2 líquido em um cadinho. Em seguida a amostra foi homogeneizada em 2,5 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM [pH 7,5 contendo 1mM de EDTA (0,372 g/L tampão), 3 mM de DTT (0,462 g/L tampão)] e 4% (p/v) de PVPP foi adicionado, de acordo a metodologia de Gomes Jr.*et al*. (2006). As amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 35min a 4°C e alíquotas de 200 μ L do sobrenadante foram retiradas e armazenadas em freezer -80°C em tubos de 500 μ L até o momento das análises. A quantificação foi determinada segundo o método de Bradford (1976). O extrato proteico obtido foi utilizado na determinação da atividade das enzimas SOD, CAT e APX a fim de avaliar a ação destas enzimas na presença do cobre.

2.2.4. Determinação da atividade de Superóxido dismutase (SOD)

A determinação da atividade total da SOD, foi realizada por espectrofotometria, seguindo a metodologia de Giannopolitis & Ries (1977). O sobrenadante da extração de proteínas obtido no item 2.2.3 foi utilizado, com a adição do tampão fosfato de sódio 50 mmol/L (pH 7,8), contendo 50 mM metionina, 1 mM NBT, 10 mM EDTA e 0,1 mM riboflavina.

As amostras permaneceram por 5 min sob exposição de luz, e em seguida a leitura em espectrofotômetro a 560 nm foi realizada. Para a calibração das amostras dois ensaios-brancos (branco A e branco B) foram realizados, o branco A foi mantido sob a luz juntamente com as amostras e o branco B foi envolvido por papel alumínio para evitar a luz. Os valores da atividade da SOD foram obtidos através da equação abaixo, e o resultado foi expresso em U SOD/mg de proteína:

$$\Delta E_{\text{atividade da SOD}} = (\text{ABS formazan total} - \text{absorbância do branco A (nm)}) / \text{ABS amostra} \dots \dots 1 * (1000 / \text{volume enzima} * 1 / [\text{proteína brad.]})$$

2.2.5. *Determinação da atividade de catalase (CAT)*

Para determinação da atividade desta enzima, foi utilizada a metodologia descrita por Kraus e colaboradores (1995) com as modificações realizadas por Azevedo e colaboradores (1998). Inicialmente foram adicionados 25 µL de extrato vegetal obtido no item 2.2.3 em um falcon de 15 mL onde foi adicionada uma solução contendo 10 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) acrescida de 25 µL de H₂O₂ (solução 25%). Em seguida, a degradação de H₂O₂ foi monitorada por espectrofotômetro a 240 nm (pico de absorção do H₂O₂), durante o período de 1 minuto e dosagem contínua em intervalos de 1 segundo em temperatura ambiente, em cubetas de quartzo, sendo utilizadas 2 cubetas por ensaio. Os resultados foram expressos em µmol/min/mg prot.

2.2.6. *Determinação da atividade de ascorbato peroxidase (APX)*

Para a determinação da atividade desta enzima, a metodologia sugerida por Nakano e Asada (1981) foi utilizada. Para realização deste ensaio, 50 µL do extrato vegetal obtido no item 2.2.3 foram acrescidos de 650 µL de Tampão fosfato de potássio 80 mM (pH 7,0), 100 µL de Ascorbato 5mM, 100 µL de EDTA 1mM e 100 µL de H₂O₂ 1 mM. A atividade dessa enzima foi determinada por fotometria a 290 nm durante 1 minuto. Esta metodologia foi otimizada para placas de 96 poços apropriadas para leituras a 290 nm no aparelho Varioskan. Os resultados obtidos foram expressos em µM/min/mg prot

3. RESULTADOS

3.1. Experimento 1 - ensaio com *X. citri*

3.1.1. Análise de sintomas

A severidade da doença bem como imagens representativas dos dois tratamentos em cada avaliação está apresentada na figura 4. Não houve diferenças significativas entre o tratamento preventivo e o controle (Figura 4). Isso sugere que, em condições de casa de vegetação, o cobre não conseguiu prevenir o desenvolvimento de cancro cítrico, mas foi capaz de contê-lo. Enquanto isso, no tratamento curativo observa-se aumento significativo de sintomas (Figura 4), o que sugere que o cobre possui algum efeito negativo na planta que favorece o desenvolvimento dos sintomas de cancro cítrico.

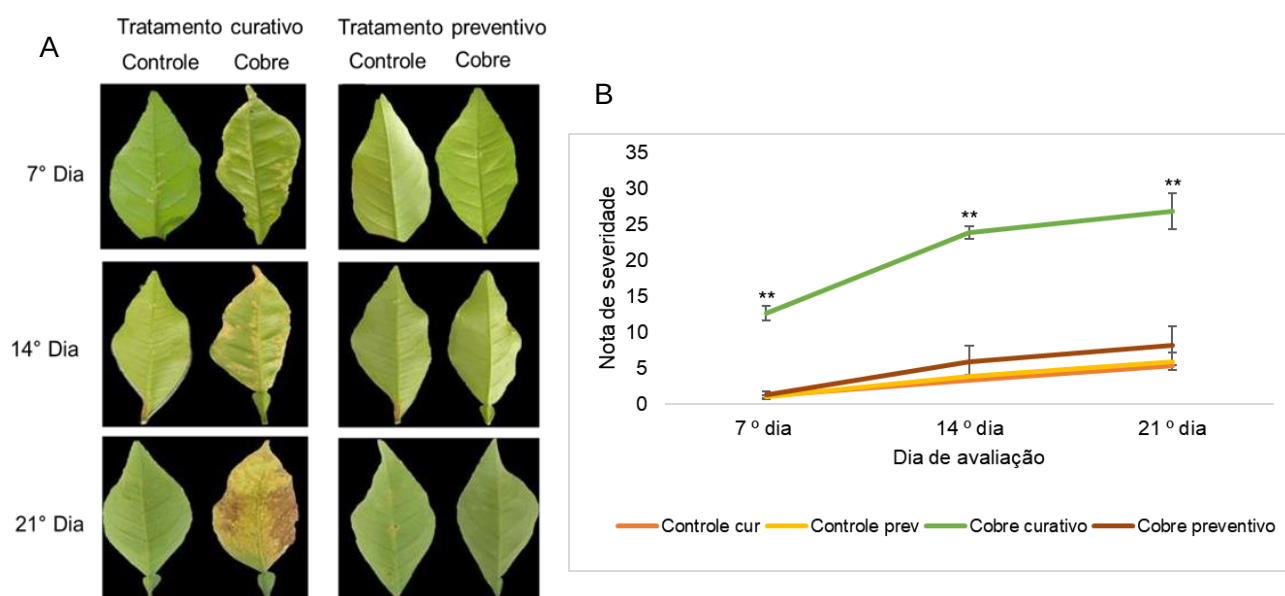


Figura 4. Severidade dos sintomas do cancro cítrico em plantas submetidas aos tratamentos curativo e preventivo com e sem cobre. A. Sintomas observados nos 7º, 14º e 21º dia após pulverização das bactérias. B. Média da severidade dos sintomas do cancro cítrico. As médias são referentes a 5 plantas individuais cuja nota foi atribuída por três independentes avaliadores, seguindo a escala diagramática para cancro cítrico (Belasque et al., 2005). Asteriscos representam diferença significativa através do teste *t* de Student ($p < 0,05$) e NS representa valores não significativos ($p > 0,05$).

3.1.2. Análise de expressão gênica

Após a extração do RNA total, a integridade das amostras foi visualizada em gel de agarose (Figura 5), e essas foram mensuradas por espectrofotometria (NanoDrop 8000 - Thermo Fisher Scientifics) (Tabela 3).

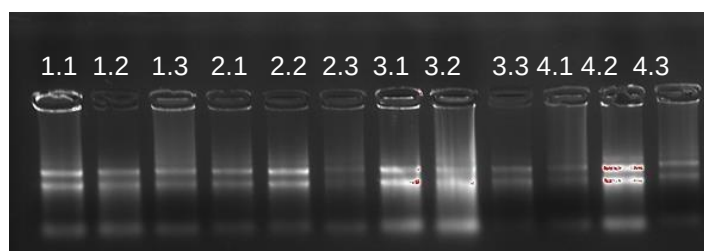


Figura 5. Gel de qualidade amostras de RNA em gel de agarose 1%. (1) Réplicas tratamento curativo. (2) Réplicas controle tratamento curativo. (3) Réplicas tratamento preventivo. (4) Réplicas controle tratamento preventivo.

Tabela 3. Quantificação das amostras de RNA extraídas por Trizol por espectofotometria. (1) Réplicas tratamento curativo. (2) Réplicas controle tratamento curativo. (3) Réplicas tratamento preventivo. (4) Réplicas controle tratamento preventivo.

Amostra	ng/ μ L	260/280	260/230
1.1	1336	1,93	2,3
1.2	588	1,79	1,72
1.3	390,2	1,94	1,9
2.1	1056	1,89	2,34
2.2	1558	1,84	1,70
2.3	867	1,91	2,11
3.1	1330	1,97	2,10
3.2	661,5	1,76	1,66
3.3	1357	2,06	2,38
4.1	1440	2,00	2,18
4.2	613	2,18	2,37
4.3	264	1,79	1,72

As amostras de RNA foram posteriormente tratadas com DNase (RQ1 Promega) e novamente foram quantificadas no Nano drop (tabela 4) para padronização.

Tabela 4. Quantificação das amostras de RNA espectrofotometria após tratamento com DNase. (1) Réplicas tratamento curativo. (2) Réplicas controle tratamento curativo. (3) Réplicas tratamento preventivo. (4) Réplicas controle tratamento preventivo.

Amostra	ng/ μ L	260/280	260/230
1.1	41,75	2,11	1,38
1.2	75,32	1,93	1,56
1.3	62,86	2,3	1,42
2.1	49,5	2,14	1,79
2.2	36,9	2,06	1,28
2.3	34,89	2,04	1,3
3.1	59,59	2,06	1,32
3.2	68,9	2,03	1,5
3.3	77,77	2,11	0,94
4.1	85,14	2,12	0,46
4.2	56,28	2,03	1,84
4.3	168,2	2,14	1,93

Após o tratamento, uma reação de PCR foi realizada para cada amostra com intuito de verificar se havia contaminação por DNA. Para tal, um par de primers que produz um amplicon de 100 pb foi utilizado e DNA total de laranja doce foi usado como controle positivo. As amostras não apresentaram amplificações, com exceção do controle positivo (Figura 6), o que demonstra que as amostras de RNA não haviam contaminação por DNA.

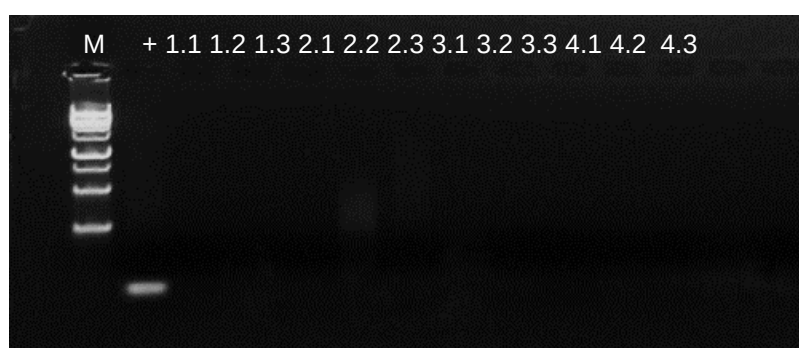


Figura 6. Produtos de PCR em gel de agarose 1%. (M) Marcador molecular leadder 1kb. (+) Controle positivo com DNA de *Citrus sinensis*. (1.1 a 1.3) RNA cobre curativo. (2.1 a 2.3) RNA controle curativo. (3.1 a 3.3) RNA cobre preventivo. (4.1 a 4.3) RNA controle preventivo.

Após a confirmação que não havia contaminação com DNA, o cDNA foi sintetizado através do kit GoScript Reverse Transcription (Promega), e a expressão dos genes associados a defesa (*PR1*) e estresse oxidativo (*Cu-Zn SOD* e *GST1*) foi realizada, utilizando o equipamento ABI 7500 Fast e o gene *ubiquitina* como normalizador. O cálculo para determinar a expressão dos genes foi realizado seguindo a metodologia descrita no item 2.1.2.

O gene *PR1*, associado ao sistema de defesa e sabidamente induzido na presença de patógenos, foi significativamente induzido no tratamento preventivo e não foi modulado no curativo (Figura 7). E com relação aos genes associados ao estresse oxidativo, *GST1* não foi modulado no tratamento preventivo e apresentou significativa repressão no tratamento curativo (Figure 7). Já o gene *CuZnSOD* apresentou indução significativa no tratamento preventivo e expressiva repressão no tratamento curativo (Figura 7), indicando aumento de estresse quando o cobre é aplicado posterior a bactéria.

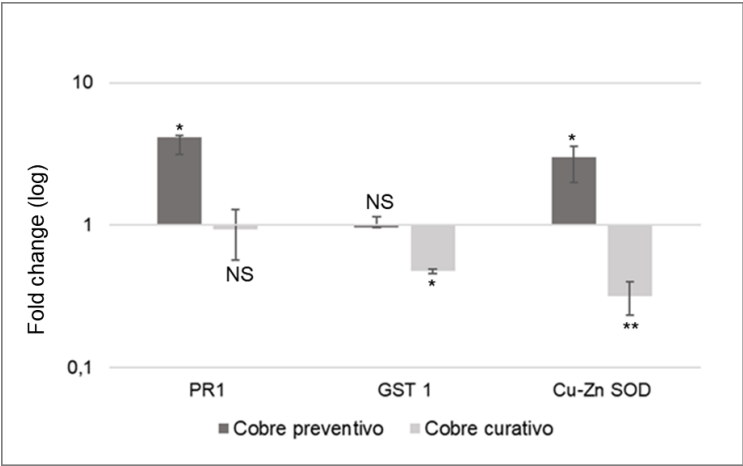


Figura 7. Perfil de expressão dos genes *PR1*, *GST1* *CuZnSOD* nos tratamentos preventivo e curativo com oxicloreto de cobre. Asteriscos representam diferença significativa através do teste t de Student. * ($p < 0,05$), **($p < 0,01$), ***($p < 0,001$) e NS valores não significativos ($p > 0,05$).

3.2. Experimento 2 - Ensaio com cobre

3.2.1. Análise de expressão gênica

Após a extração do RNA total, as amostras foram mensuradas por espectrofotometria (NanoDrop 8000 - Thermo Fisher Scientifics) (Tabela 5) e a qualidade foi visualizada em gel de agarose. Todas as amostras estavam integras (Figura 8), sendo que das cinco réplicas coletadas, apenas três de cada tratamento foram selecionadas.

Tabela 5. Quantificação das amostras de RNA por espectrofotometria. (C) Réplicas tratamento controle. (Cu) Réplicas tratamento com cobre.

1° Coleta					2° Coleta			
Amostra	ng/uL	260/280	260/230		Amostra	ng/uL	260/280	260/230
C1	722,1	1,97	1,79		C1	242,7	2,03	1,78
C2	220,7	1,85	1,10		C2	705,7	1,95	1,35
C3	962,1	1,92	1,28		C3	209,2	2,05	1,87
Cu1	504,9	2,03	1,80		Cu1	948,8	1,86	1,81
Cu2	422,3	1,94	1,41		Cu2	181,4	2,08	1,57
Cu3	676,8	2,03	1,25		Cu3	207,2	1,98	1,69

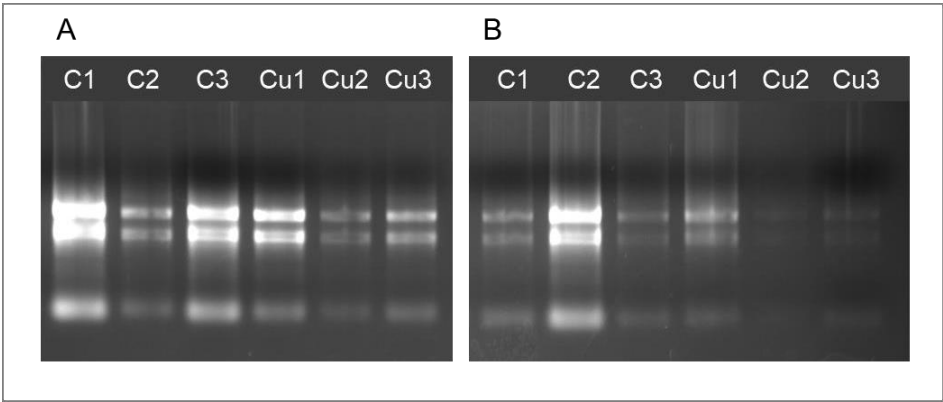


Figura 8. Gel de qualidade após extração de RNA. (A) Amostras coletadas 24h após a pulverização por cobre. (B) Amostras coletadas 48h após pulverização. (C) Réplicas tratamento controle. (Cu) Réplicas tratamento com cobre.

Confirmada a qualidade do RNA, as amostras foram tratadas com DNase (RQ1 Promega). Após o tratamento, foram novamente quantificadas (Tabela 6) e vizualidas em gel de agarose 1% por eletroforese (Figura 9). Não houve degradação das amostras durante o processo de tratamento com DNase (Figura 9).

Tabela 6. Quantificação das amostras de RNA por espectrofotometria após tratamento com DNase. (C) Réplicas tratamento controle. (Cu) Réplicas tratamento com cobre.

1° Coleta					2° Coleta				
Amostra		ng/uL	260/280	260/230	Amostra		ng/uL	260/280	260/230
1° Coleta	C1	166,8	2,10	0,86	2° Coleta	C1	526,7	2,04	1,72
	C2	118,1	2,13	0,69		C2	134,4	2,08	1,08
	C3	152,2	1,92	1,28		C3	90,01	2,12	0,93
	Cu1	130,1	2,07	1,34		Cu1	686,5	2,16	1,07
	Cu2	72,63	2,01	0,78		Cu2	123,4	2,15	2,00
	Cu3	112,9	2,12	1,02		Cu3	835,7	2,01	1,78

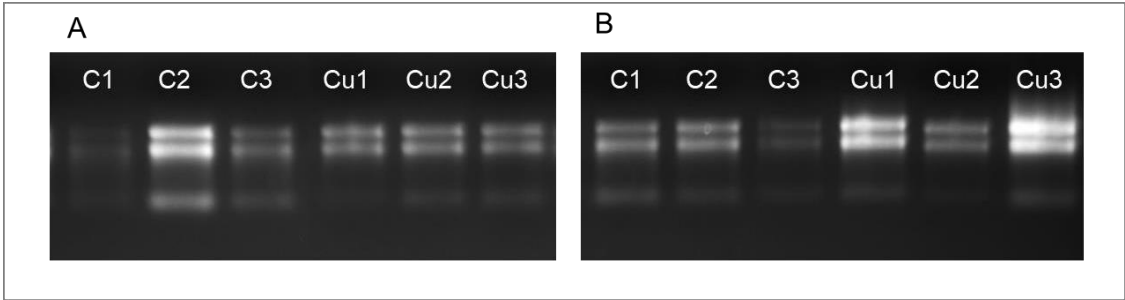


Figura 9. Gel de qualidade RNA pós tratamento por Dnase. (A) Amostras coletadas 24h após a pulverização por cobre. (B) Amostras coletadas 48h após a pulverização por cobre. (C) Réplicas tratamento controle. (Cu) Réplicas tratamento com cobre.

Para checar possível contaminação com DNA, uma reação de PCR foi realizada para cada amostra de RNA, utilizando os primers 5' GAAGGCCGAAATTCCCATATC 3' e 3' GGGAGGAGGAGATGCACTTG 5' que amplificam um gene de cópia única, e produzem um amplicon de aproximadamente 1300 pb. O DNA total de *C. sinensis* foi utilizado como controle positivo. Apenas o controle positivo amplificou na reação, indicando que as amostras de RNA não continham DNA (Figura 10).

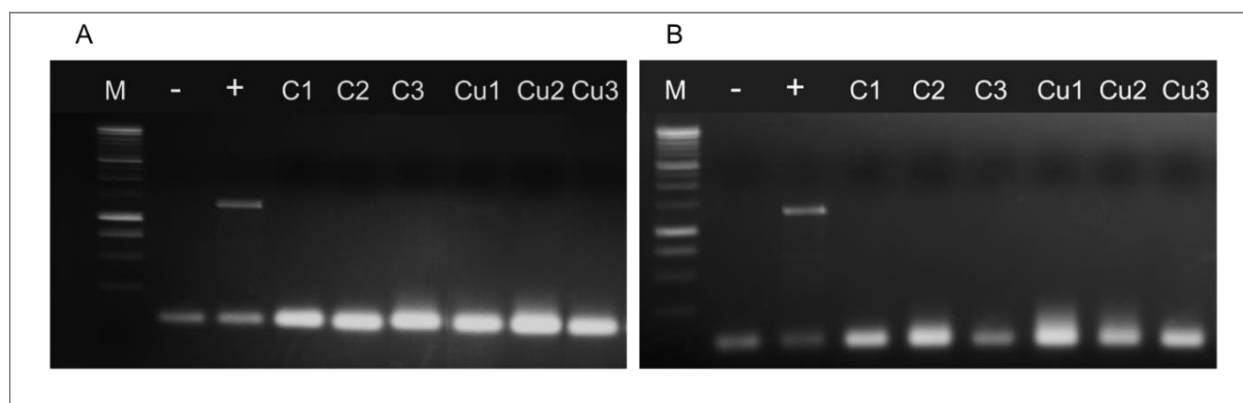


Figura 10. Produto da reação de PCR do RNA visualizado em gel de agarose 1% por eletroforese. (A) Amostras referentes a primeira coleta, 24h após a pulverização por cobre. (B) Amostras referentes a segunda coleta, 48h após a pulverização por cobre. (M) Marcador molecular 1kb. (-) Controle negativo da reação. (+) Controle positivo com DNA de *Citrus sinensis*. (C) amostras tratamento controle. (Cu) Amostras tratamento com cobre.

. As amostras de RNA tratadas foram padronizadas e o cDNA foi sintetizado. A partir do cDNA, a expressão dos genes *PR1*, *EDS1*, *SGT1*, *GST*, *APX* e *CuZnSOD* foi determinada via RT-qPCR. O gene *PR1* foi significativamente reprimido nos dois tempos de coleta, *EDS1* foi significativamente expresso após 24h de exposição ao cobre e não foram modulados após 48h (Figura 11). O contrário pode ser observado no comportamento do gene *SGT1*, que não foi modulado após 24h e apresentou expressão significativa após 48h (Figura 11), sugerindo que houve alterações no mecanismo de defesa em detrimento da aplicação do cobre. Já com relação aos genes associados ao estresse oxidativo, *GST1* foi significativamente expresso após 24h e não foram modulados após 48h, o gene *APX*, que codifica a proteína ascorbato peroxidase, não foi modulado em nenhuma das coletas e *CuZnSOD* não foi modulado após 24h e significativamente reprimido após 48h (Figura 11), indicando um desbalanço no mecanismo antioxidante.

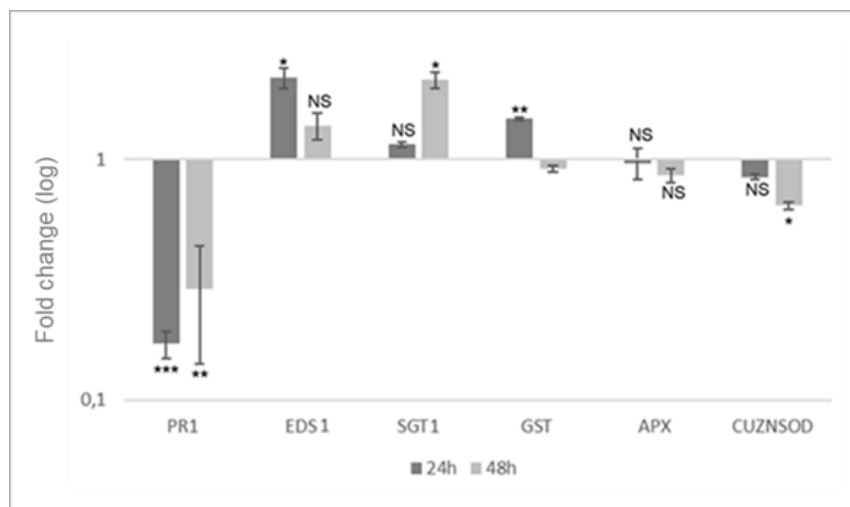


Figura 11. Perfil de expressão dos genes *PR1*, *EDS1*, *SGT1*, *GST*, *APX* e *CuZnSOD* 24h e 48h após a pulverização do cobre. Asteriscos representam diferença significativa através do teste t de Student. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) e NS valores não significativos ($p > 0,05$).

3.2.2. Quantificação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O teor de H_2O_2 foi determinado com base na elaboração de uma curva padrão, que se deu pela quantificação de amostras com concentrações conhecidas de H_2O_2 . A quantificação das amostras foi realizada em triplicata e a média das réplicas foi utilizada para elaboração da curva (Figura 12). A curva apresentou um R^2 de 0,99 o que permite maior confiabilidade na estimativa do H_2O_2 (Figura 12). A quantidade de H_2O_2 foi significativamente maior após 24h (Figura 13A) e marginalmente significativa após 48h quando comparada ao controle (Figura 13B), indicando o aumento de produção de ROS na presença do cobre.

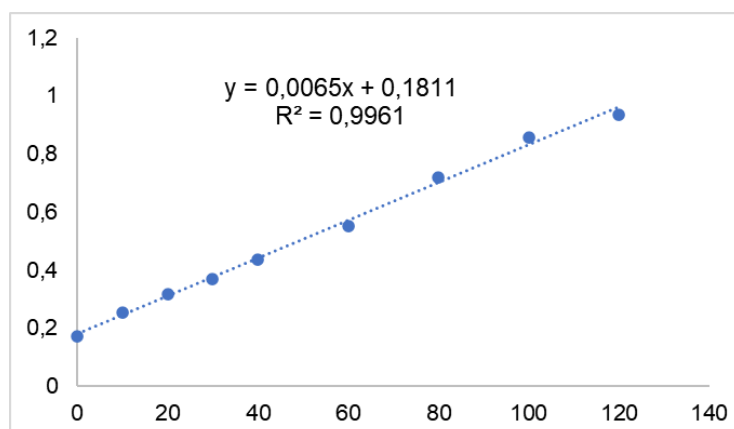


Figura 12. Correlação entre absorbância a 390 nm e concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em μM . Equação utilizada para quantificação das amostras: $Y = 0,0065x + 0,1811$. A curva apresentou um valor de $R^2 = 0,9961$.

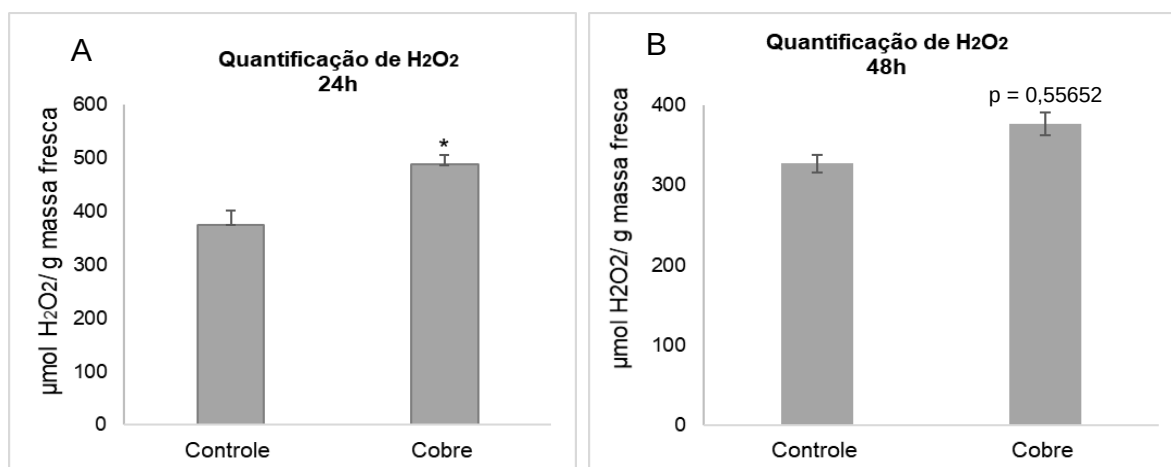


Figura 13. Gráficos indicando a quantidade de H₂O₂ por grama de matéria fresca na ausência e presença de cobre. (A) Valores referentes a coleta realizada 24h após a pulverização. (B) Valores referentes a coleta realizada 48h após a pulverização. Asteriscos representam diferença significativa através do teste t de Student. * (p < 0,05).

3.2.3. Extração de proteínas

Para a determinação das atividades enzimáticas de SOD, CAT e APX, a extração de proteínas totais das amostras foi realizada. Após a extração, foi construída uma curva padrão de albumina bovina (BSA) (Figura 14) para determinar a concentração proteica das amostras. Para elaboração da curva a média de triplicata de amostras com concentração conhecida de BSA foi utilizada. A curva apresentou R² de 0,98 demonstrando alta confiabilidade para estimar as quantidades de proteínas (Figura 14). As quantidades de proteínas foram estimadas utilizando a equação da reta (Figura 14) e foram demonstradas na Tabela 7.

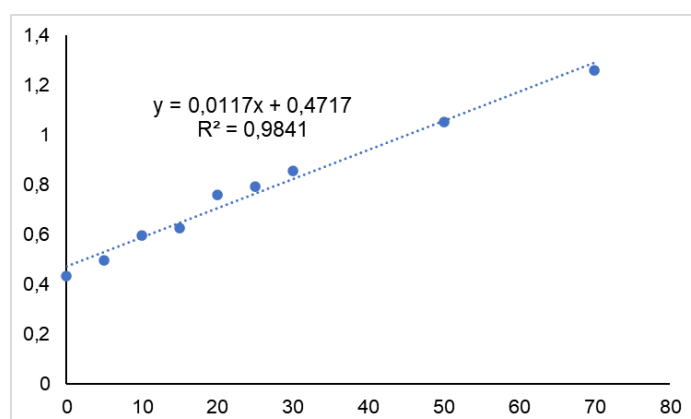


Figura 14. Correlação entre absorbância a 595nm e concentração de albumina bovina (BSA). Equação utilizada para quantificação das amostras: $Y = 0,0117x + 0,4717$. A curva apresentou um valor de $R^2 = 0,9841$.

Tabela 7. Concentração de proteínas totais, valores expressos em ng/μl.

	Amostra	ng/uL		Amostra	ng/uL
1° Coleta (24h)	C1	14,083	2° Coleta (48h)	C1	32,96
	C2	7,4221		C2	18,688
	C3	18,883		C3	19,936
	C4	6,2722		C4	11,221
	C5	15,335		Cu1	18,626
	Cu1	13,508		Cu2	26,786
	Cu2	18,994		Cu3	14,428
	Cu3	9,8053		Cu4	24,152
	Cu4	15,772		Cu5	24,3
	Cu5	16,305			

3.2.4. Determinação da atividade de Superóxido dismutase (SOD)

Após 24h da pulverização do cobre, a atividade da SOD não apresentou diferença significativa (Figura 15A). Mas, curiosamente, após 48h da aplicação desse metal sua atividade foi menor quando comparada ao controle (Figura 15B), indicando que ocorreu desbalanço dessa enzima em maior tempo exposição ao cobre.

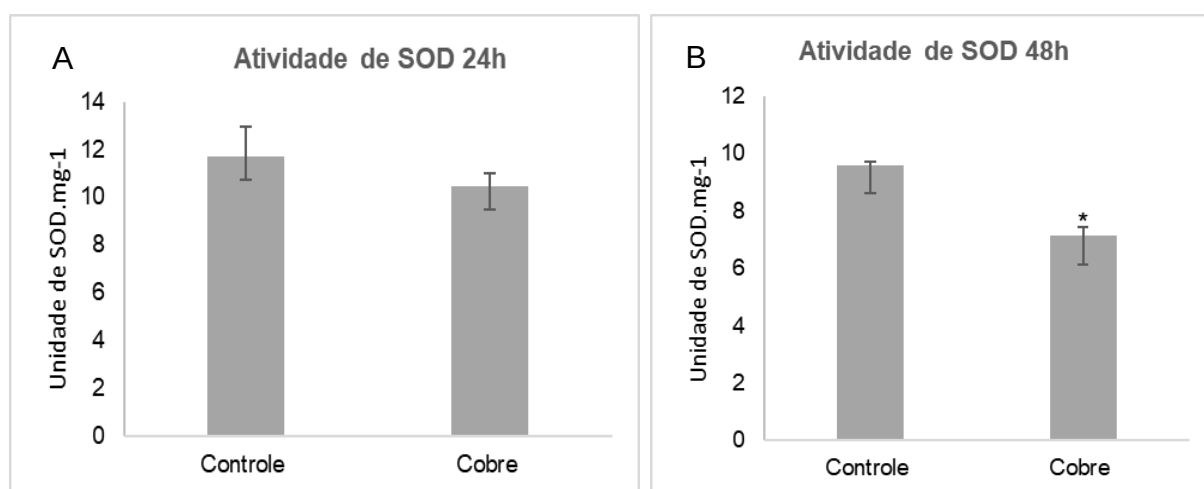


Figura 15. Gráficos indicando unidades de SOD por mg de proteína na ausência e presença de cobre. (A) Valores referentes a coleta realizada 24h após a pulverização. (B) Valores referentes a coleta realizada 48h após a pulverização. Asteriscos representam diferença significativa através do teste t de Student. * ($p < 0,05$).

3.2.5. Determinação da atividade de catalase (CAT)

A atividade da não apresentou diferença significativa em nenhum dos tempos de coleta (Figura 16), indicando a não atividade dessa enzima na presença do cobre.

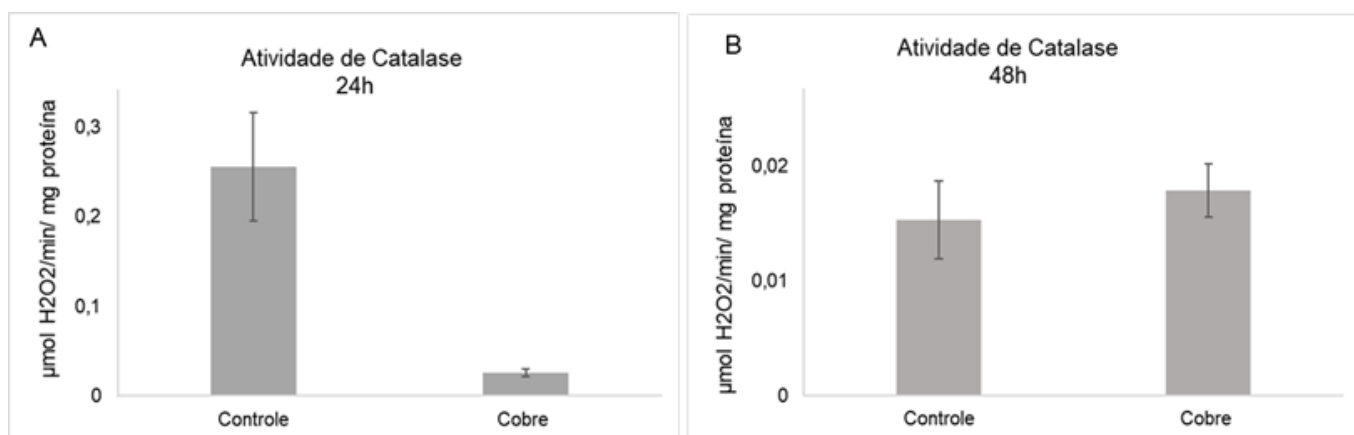


Figura 16. Gráficos indicando a atividade de CAT na ausência e presença de cobre. (A) Valores referentes a coleta realizada 24h após a pulverização. (B) Valores referentes a coleta realizada 48h após a pulverização. Asteriscos representam diferença significativa através do teste t de Student. * ($p < 0,05$).

3.2.6. Determinação da atividade de ascorbato peroxidase (APX)

Após 24h, a atividade da enzima APX não apresentou diferença significativa na presença do cobre (17A). Ao passo que após 48h, sua atividade foi significativamente menor quando comparada ao controle (17B), sugerindo que a presença do cobre resultou na diminuição da atividade dessa enzima.

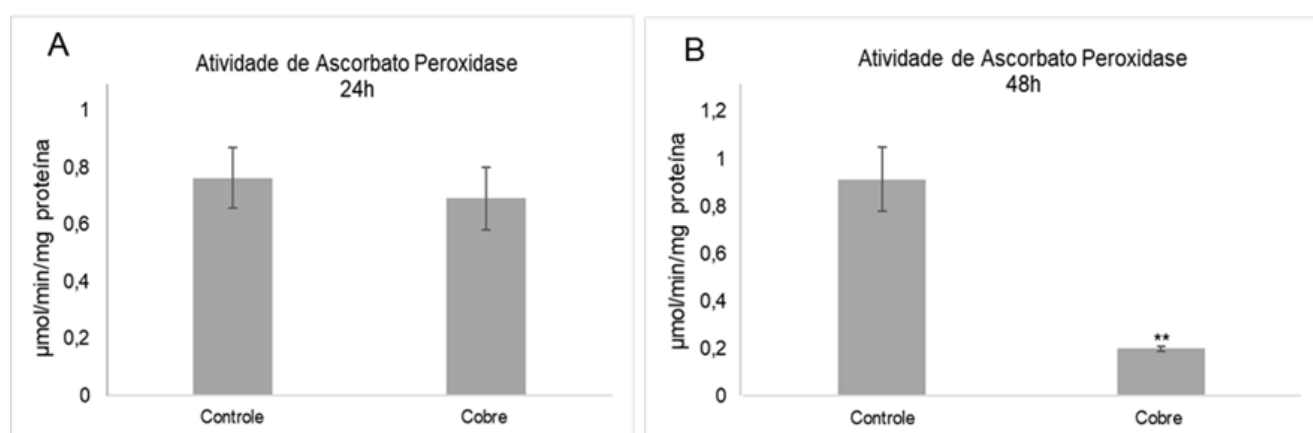


Figura 17. Gráficos indicando a atividade de APX na ausência e presença de cobre. (A) Valores referentes a coleta realizada 24h após a pulverização. (B) Valores referentes a coleta realizada 48h após a pulverização. Asteriscos representam diferença significativa através do teste t de Student. ** ($p < 0,01$).

4. DISCUSSÃO

4.1. Experimento 1 – Ensaio com *X. citri*

No tratamento preventivo, não houve diferença significativa na severidade do cancro cítrico quando comparado ao controle (Figura 6). As partículas de cobre são tóxicas as células

bacterianas e sua ação ocorre por meio da adesão dessas partículas à superfície das folhas. Essas partículas formam uma barreira protetora, que atua como um reservatório de íons de cobre, os quais são liberados lentamente em contato com a água e baixo pH. (BEHLAU, *et al.*, 2010). Essa camada protetora na folha, pode ter impedido a penetração da bactéria no tecido vegetal de forma eficiente, uma vez que a aplicação de *X. citri* foi posterior a solução de cobre. Assim, as células bacterianas que conseguiram entrar nos tecidos vegetais, por meio dos estômatos ou demais aberturas, foram possivelmente, reconhecidas pelas plantas, ativando a resposta de defesa PTI. A expressão do gene *PR1* no tratamento preventivo (Figura 7) indica ativação de PTI, uma vez que o gene *PR1* é sabidamente um marcador de imunidade inata, sendo um importante fator de regulação das respostas de resistência sistêmica adquirida (SAR) dependentes de ácido salicílico (PIETERSE e VAN LOON, 2004). Na ausência do cobre possivelmente a bactéria consegue driblar o reconhecimento da planta, então *PR1* não é eficientemente ativo. Como o cobre retarda a capacidade de colonização da bactéria, ocorre um melhor reconhecimento pela planta e consequentemente uma maior ativação de *PR1*.

No tratamento curativo, a presença do cobre, de alguma forma, potencializou os sintomas (Figura 6), e concordante a isso, o gene *PR1* não foi modulado (Figura 7), indicando que o sistema imune inato não foi acionado, diferentemente do tratamento preventivo. Provavelmente, nesse tratamento, a bactéria já havia se estabelecido na folha e driblou o sistema de defesa, o que pode ser confirmado pela expressão do gene *PR1*, visto que a barreira protetora do cobre se formou depois da penetração de *X. citri* nos tecidos foliares. O aumento de sintomas pode ter ocorrido pelo acúmulo excessivo de espécies reativas de oxigênio (ROS), formadas tanto em resposta a *X. citri* quanto em resposta a presença do cobre.

A fim de estabelecer essa relação, a expressão dos genes antioxidantes *GST1* e *Cu-ZnSOD* foi realizada (Figura 7). De acordo com Mendes (2009), o gene *GST1* codifica a proteína glutathione S-transferase, que atua na via de desintoxicação celular, visando diminuir os níveis de radicais livres oriundos do estresse oxidativo, podendo ser expresso tanto em resposta a fatores abióticos quanto bióticos (MENDES *et al.*, 2009). Esse gene não foi modulado no tratamento preventivo, mas curiosamente, foi reprimido no tratamento curativo, indicando que o mecanismo de desintoxicação do hospedeiro foi de alguma forma perturbado nesse tratamento. Já o gene *Cu-ZnSOD*, que codifica a enzima cobre zinco - superóxido dismutase, foi significativamente induzido no tratamento preventivo. A indução desse gene no tratamento preventivo pode estar relacionada a percepção da bactéria, e consequente, ativação do mecanismo de detoxificação de ROS. O contrário foi observado no tratamento curativo, dado que *Cu-Zn SOD* foi significativamente reprimido nesse tratamento, apontando

um possível desbalanço do mecanismo detoxificante.

Com base nos resultados obtidos nesse experimento, o experimento 2 foi elaborado, visando compreender como o cobre atua no sistema de defesa da planta na ausência do patógeno, e se, o aumento de severidade observado no tratamento curativo está relacionado ao aumento de estresse oxidativo ocasionado pelo cobre.

4.2. Experimento 2 – Ensaio com cobre

Os resultados obtidos nesse experimento foram compilados na figura 18. Na ausência da bactéria, o gene *PR1* foi expressivamente reprimido sugerindo que, a presença do cobre está interferindo negativamente no mecanismo de defesa inata contra patógenos. Provavelmente, devido a essa interação, as plantas de *C. sinensis* (já infectadas) ficaram ainda mais vulneráveis à ação de *X. citri* no tratamento curativo. A fim de melhor compreender essa interação, a expressão dos genes *EDS1*, *SGT1* também relacionados a defesa contra patógenos, foi realizada. Conforme Shi e colaboradores (2015), ambos os genes estão envolvidos nos primeiros eventos de reconhecimento de patógenos em plantas e são importantes para a resistência mediada pelo gene R (ETI). O gene *EDS1* apresentou indução significativa após 24h da pulverização por cobre e depois de 48h não foi regulado. Já o gene *SGT1*, não foi modulado após 24h de pulverização, mas curiosamente, apresentou significativa expressão após 48h.

A expressão dos genes relacionados ao estresse oxidativo, também foi realizada como no experimento 1, com acréscimo do gene *APX*, que codifica a enzima Ascorbato peroxidase. O gene *GST1* apresentou significativa indução após 24h da pulverização com cobre e não foi modulado após 48h, indicando que provavelmente, a via de detoxificação foi ativada nas primeiras 24h. O gene *APX*, não foi modulado em nenhuma das duas coletas, sugerindo que o cobre não modificou a atividade dessa enzima. O gene *CuZnSOD*, não foi modulado após 24h da pulverização, mas após 48h apresentou repressão significativa, apontando a não atividade dessa isoforma de SOD, responsável por dismutar o radical superóxido de hidrogênio.

Para avaliar se a presença do cobre na concentração de 0,1% ocasionou estresse oxidativo, o teor de peróxido de hidrogênio e a atividade de enzimas antioxidantes SOD, CAT e APX foram determinados. Conforme o esperado, o aumento no teor de H_2O_2 foi detectado nos dois tempos de coleta, sendo significativamente maior após 24h e marginalmente significativo 48h após a aplicação de cobre, apontando que o cobre aumentou a produção de ROS. O aumento de H_2O_2 observado é concordante com Hippler (2018), que observou aumento de H_2O_2 após aplicação cúprica via foliar em *Citrus sinensis*. Sabe-se que o excesso

de ROS, pode resultar em danos no aparelho fotossintético causando danos celulares drásticos e clorose nas folhas (DESIKAN *et al.*, 2002). Para que a célula possa resistir aos efeitos tóxicos de ROS, um efetivo sistema antioxidante enzimático e não enzimático pode orquestrar a concentração de ROS nos mais variados componentes e compartimentos sub-celulares (MITTLER, 2002). Portanto, quando o sistema antioxidante está em efetivo funcionamento, as enzimas antioxidantes encontram-se em atividade.

A enzima SOD não apresentou diferença significativa em sua atividade após 24h de pulverização, e manifestou diminuição significativa em sua atividade após 48h. A baixa atividade dessa enzima, sugere que o H_2O_2 se formou via mecanismos não enzimáticos. Segundo Azevedo e colaboradores (1998), a alteração no padrão de atividade desta enzima é bastante variável e pode depender do tipo de estresse, da espécie, tecido e fases de desenvolvimento da planta.

As enzimas CAT e APX atuam na quebra do H_2O_2 e são indispensáveis para eliminação dessa espécie reativa. De acordo com Mittler (2002), a principal diferença entre essas enzimas, consiste na afinidade com este composto. A CAT tem uma afinidade com o H_2O_2 para valores da ordem de micromolar, e atua na eliminação de seu excesso. Ao passo que a APX atua em quantidades de H_2O na ordem dos milimolares, podendo estar associada a sinalização e regulação do excesso de H_2O_2 . A CAT não apresentou diferença significativa em nenhum dos tempos de coleta. Revelando que, o excesso de H_2O_2 , pode não estar sendo eliminado. A atividade da enzima APX também não foi significativa após 24h da pulverização por cobre, porém, curiosamente apresentou atividade significativamente menor que a do tratamento controle após 48h. De certa forma, as enzimas antioxidantes apresentaram um desbalanço frente a pulverização por cobre, o que juntamente com o aumento de H_2O_2 , resultam em um indicativo de que a presença deste metal ocasionou estresse oxidativo.

Possivelmente, está ocorrendo um *trade off* entre o estresse oxidativo e o mecanismo defesa contra patógenos. De acordo com Kneitel & Chase (2004), o conceito de *trade-off* consiste na incapacidade de os organismos serem extremamente eficientes na realização de todas as suas atividades ao mesmo tempo. Isso ocorre porque o bom desempenho em relação a uma função, pode implicar em prejuízo em relação a uma outra função. Portanto, o aumento de estresse oxidativo causado na presença do cobre, caracterizado pelo aumento no teor de H_2O_2 e o desbalanço das enzimas antioxidantes, acarretou a diminuição da eficiência do mecanismo de defesa contra patógenos. Tal fato pode ser observado pela não modulação do gene *PR1* e aumento de sintomas no tratamento curativo e pela expressiva repressão desse gene na ausência da bactéria.

Mecanismo	Composto	24h	48h
Estresse oxidativo	H ₂ O ₂	↑	↑
	SOD	NS	↓
	CAT	NS	NS
	APX	↓	↓
	APXchl	NS	NS
	CuZnSOD	NS	↓
Defesa vegetal	PR1	↓	↓
	GST1	↑	NS
	EDS1	↑	NS
	SGT1	NS	↑

Figura 18. Compilado dos resultados observados no experimento 2, na ausência da bactéria. (Setas verdes) Indicam o aumento dos compostos e indução dos genes. (Setas laranjas) Indicam diminuição e repressão. (NS) Indicam resultados não significativos.

5. CONCLUSÃO

Como conclusão desenvolvemos um modelo biológico, o qual devido a suscetibilidade de *C. sinensis* (L.) Osbeck a *X. citri*, ocorreu a colonização o mesófilo e bloqueio o sistema de defesa da planta por meio da secreção de efetores. Contudo, a aplicação preventiva de cobre, embora sabidamente induza estresse oxidativo, impossibilitou a bactéria de colonizar efetivamente o mesófilo foliar, mas possibilitou o reconhecimento pela planta que ativou os genes de defesa. A aplicação de cobre em *C. sinensis* sem a presença da bactéria, aumentou as espécies reativas de oxigênio e causou um desbalanço na atividade das enzimas antioxidantes, além da repressão da defesa da planta. Esses resultados associados ao fato de a planta já estar com as defesas bloqueadas pela *X. citri* no tratamento curativo, possibilitam uma maior susceptibilidade da planta uma vez que ela está lidando com estresses biótico e abiótico ao mesmo tempo, o que favoreceu o aparecimento de sintomas mais severos.

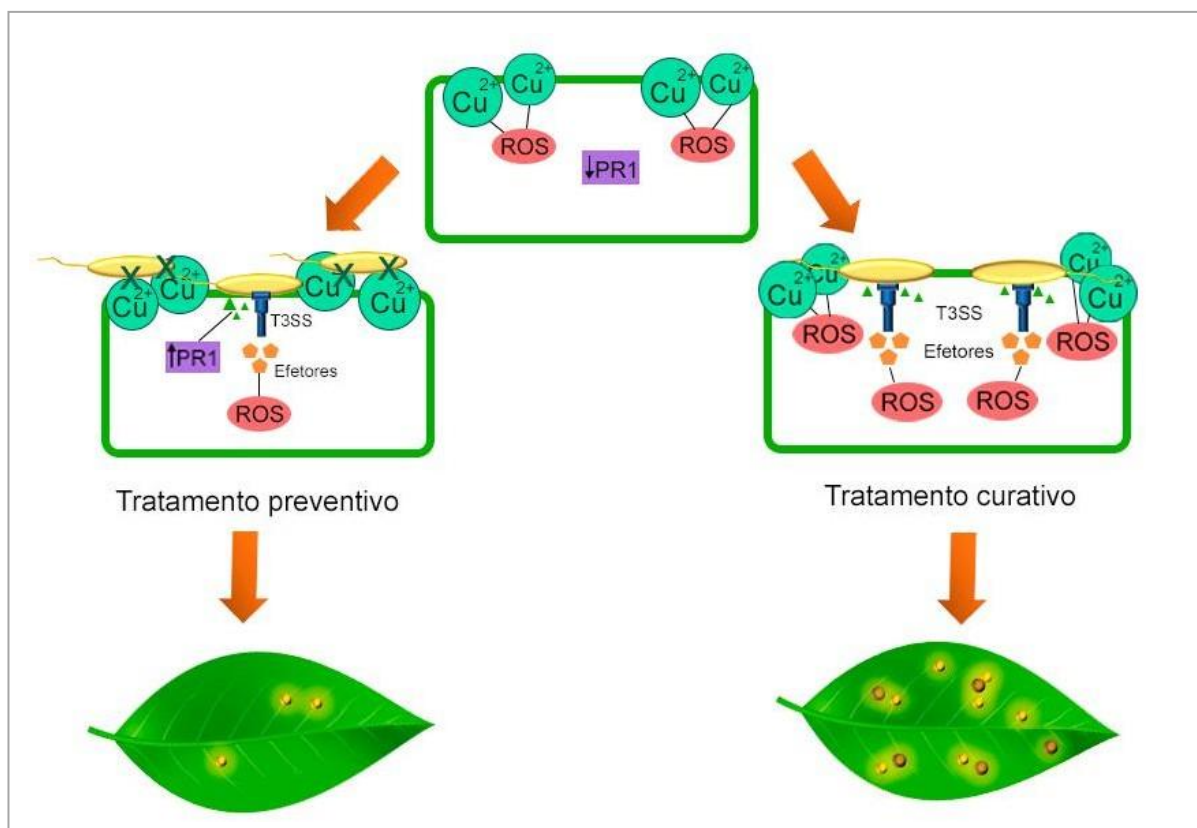


Figura 19. Modelo biológico representando o que possivelmente está ocorrendo no mesófilo da folha quando o cobre é aplicado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADREES, M.; ALI, S.; RIZWAN, M.; IBRAHIM, M.; ABBAS, F., FARID, M.; ZIA-UR-REHMAN, M.; IRSHAD, M. K. & BHARWANA, S. A. The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: A review. **Environmental Science and Pollution Research International** v.22, n.11, p.8148-8162, 2015.
- ALEXIEVA, V. I.; SERGIEV, S.; MAPELLI, E.; KARANOV. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**. v. 24, p.1337–1344, 2001.
- ALSCHER R.G. and HESS J.L. Antioxidants in higher plants (eds), p. 31-58. Boca Raton: CRC Press
- ALVA, A. K. & CHEN E. Q. Effects of external copper concentrations on uptake of trace elements by citrus seedlings. **Soil Science** v.159, n.1, p.59-64, 1995.
- AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J., LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase- deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v.104, p.280-292, 1998
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; *et al.* Estresse oxidativo: implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n.4, p.629-643, 2010.
- BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. A.; WILLADIN, L.; ULISSES, C.; CAMARAI. T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v.44, n.3, p. 453 -460, 2014
- BEHLAU, F.; BELASQUE, J.; BERGAMIN FILHO, A.; GRAHAM, JH, LEITE, R. P.; & GOTTWALD, T. R. Pulverizações e quebra-ventos de cobre para o controle do cancro cítrico em laranjeiras jovens no sul do Brasil. **Crop Protection**, v.27, n. 3- 5, p.807–813, 2008.
- BEHLAU F, BELASQUE JUNIOR J, GRAHAM JH & LEITE JUNIOR RP Effect of

frequency of copper applications on control of citrus canker and the yield of young bearing sweet orange trees. **Crop Protection** v. 29, n. 3, p. 300-305, 2010.

BELASQUE JÚNIOR, J., BASSANEZI, R. B., SPÓSITO, M. B., RIBEIRO, L. M., JESUS Junior, W. C. De, & AMORIM, L. Escalas diagramáticas para avaliação da severidade do cancro cítrico. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n.4, p.387–393, 2005.

BERGAMO, H. A. S. N-acetilcisteína em plantas cítricas infectadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus*: Efeitos no título bacteriano e no hospedeiro. Dissertação (Mestrado em genética e biologia molecular) – Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP, p. 83, 2019.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.48-254, 1976.

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. Instrução Normativa nº21, de 25 de abril de 2018. Institui os critérios e procedimentos para o estabelecimento e manutenção do status fitossanitário relativo à praga denominada Cancro Cítrico (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*). Diário Oficial da União, Brasília, 11 de maio de 2018. N 90, Seção 1, p.9.

BRIAT, J. F.; LEBRUN, M. Plant responses to metal toxicity. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III- **Sciences de la Vie**, v. 322, n. 1, p. 43-54. Jan. 1999

BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**. v. 4, p. 141–157, 2003.

CAMBROLLÉ, J.; MANCILLA-LEYTÓN, J.M.; MUÑOZ-VALLÉS, S.; LUQUE, T.; FIGUEROA, M.E. Tolerance and accumulation of copper in the salt-marsh shrub *Halimione portulacoides*. Marine Pollution Bulletin, v. 64, p. 721–728, 2012.

CITRUSBR. Exportações de Suco, 2021. Disponível em <https://citrusbr.com/estatisticas/exportacoes/>. Acesso em: 12 de Abril de 2022.

DESIKAN, R.; GRIFFITHS, R.; HANCOCK, J.; NEILL, S. A new role for an old enzyme: Nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. **PNAS**, v. 99, n. 25, p. 16314-16318, 2002.

DIETZ, K. Thiol-Based Peroxidases and Ascorbate Peroxidases: Why Plants Rely on Multiple Peroxidase Systems in the Photosynthesizing Chloroplast? **Molecules and Cells**, v. 39, n. 1, p. 20–25, 2016.

EMAMVERDIAN, A.; DING, Y.; MOKHBERDORAN, F.; XIE, Y. Heavy Metal Stress and Some Mechanisms of Plant Defense Response. **The Scientific World Journal**, 2015. Article ID 756120, 2015.

FAO. Food and Agriculture of the United Nations. Statistical Databases. Disponível em <<http://faostat.fao.org/faostat>>. Acesso em: 15 de abril de 2021.

FUNDECITRUS. Levantamento da incidência das doenças do citros: Greening, CVC e Cancro cítrico no cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro, 2021. Disponível em <https://www.fundecitrus.com.br/pdf/levantamentos/Relatorio_levantamento_de_doencas_2_021-greening_CVC_e_cancro_citrico.pdf>. Acesso em 20 de abril de 2022.

FUNDECITRUS. Reestimativa de safra 2021/22 do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro, 2022. Disponível em <https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/0422_Fechamento_da_Safra_de_Laranja.pdf>. Acesso em 18 de abril de 2022.

GCONCI – Revista do grupo de consultores em citros. n. 113, 2017. Disponível em <https://www.gconci.com.br/Conteudo/Pdf/Revistas/113.pdf>. Acesso em <08 de março de 2021>.

GIANNOPOLITIS C. N. & RIES, S. K. Superoxide dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, n. 44, p. 147–159. 1975.

GOMES JR., R.A.; MOLDES, C.; DELITE, F.S.; GRATÃO *et al.* Antioxidant Metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. **Chemosphere**, v. 65, n.8, p. 1330-1337, 2006.

GÓMEZ, L. M.; TEIXEIRA-SILVA, N. S.; CASERTA, R.; TAKITA, M. A.; MARQUES, M. O. M.; SOUZA, A. A. Overexpression of *Citrus reticulata* SAMT in *Nicotiana tabacum* increases MeSA volatilization and decreases *Xylella fastidiosa* symptoms. **Planta** v. 252, n. 103, p. 1-14, 2020.

HIPPLER, F. W. R.; BOARETTO, R. M.; QUAGGIO, J. A.; MATTOS-JR., D. Copper in Citrus: required but avoided. **Citrus Research & Technology**, v.38, n.1, p.100-106,2017.

HIPPLER, F.W.R.; PETENÁ, G.; BOARETTO, R. M.; QUAGGIO, J. A.; AZEVEDO, R. A.; MATTOS-JR, D. Mechanisms of copper stress alleviation in Citrus trees after metal uptake by leaves or roots. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p.13134–13146, 2018.

IBGE. Sidra: sistema IBGE de recuperação automática. Tabela de rendimento médio por ano da safra da laranja. Disponível em <sidra.ibge.gov.br>. Acesso em 14 de abril de 2021.

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

KANEMATSU S. & ASADA K. Characteristic Amino Acid Sequences of Chloroplast and Cytosol Isozymes of CuZn-Superoxide Dismutase in Spinach, Rice and Horsetail. **Plant Cell Physiology**, v. 31, n. 1, p. 99–112. 1990.

KNEITEL, J & CHASE, J. M. Trade-offs in community ecology: Linking spatial scales and species coexistence. **Ecology Letters**. v. 7, n.1, p.69–80. 2004.

KRAUS T. E., MCKERSIE B. D., FLETCHER R. A. Paclobutrazol-induced Tolerance of Wheat Leaves to Paraquat May Involve Increased Antioxidant Enzyme Activity. **Journal of Plant Physiology**, v. 145, n. 4, p. 570–576. 1995.

LAIA, M. L., MOREIRA, L. M., DEZAJACOMO, J., BRIGATI, J. B., FERREIRA, C. B., FERRO, M. I. T., SILVA, A. C. R., FERRO, A. J., & OLIVEIRA, J. C. F. New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. **BMC Microbiol.** v. 9, n.12, 2009.

MENDES, J.M.B.; MOURÃO, F. A. A.; BERGAMIN, A.; HARAKAVA, R.; BEER, S.V.; MENDES, B. M. J. Genetic transformation of *Citrus sinensis* cv. Hamilin with *hrpN* gene from *Erwinia amylovora* and evaluation of the transgenic lines for resistance to citrus canker. **Scientia Horticulturae**, v.122, n.1, p.109 –115, 2009.

MITTLER R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in PlantScience**, v. 7, n. 9, p. 405–410. 2002.

MITRE, L. K.; TEIXEIRA-SILVA, N. S.; RYBAK, K.; MAGALHÃES, D. M.; SOUZA-NETO, R. R.; ROBATZEK, S.; ZIPFEL, C.; SOUZA, A. A. The Arabidopsis immune receptor EFR increases resistance to the bacterial pathogens *Xanthomonas* and *Xylella* in transgenic sweet Orange. **Plant Biotechnol J**, v. 19, n. 7, p. 1294-1296, 2021.

NAKANO, Y. AND ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiol.** v. 22. P.867–880, 1981.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G. Anuário da citricultura. CitrusBR. São Paulo, 2017. RIGANO, L. A., SICILIANO, F., ENRIQUE, R., SENDÍN, L., FILIPPONE, P., TORRES, P. S., QÜESTA, J., DOW, J. M., CASTAGNARO, A. P., VOJNOV, A. A. and MARANO, M. R. 2007. Biofilm Formation, Epiphytic Fitness, and Canker Development in *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. **Mol Plant Microbe Interact.** v.20, n.10, p.1222- 1230, 2007.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annual Review of **Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 249-279, 1998.

RIGANO, L. A., SICILIANO, F., ENRIQUE, R., SENDÍN, L., FILIPPONE, P., TORRES, P. S., QÜESTA, J., DOW, J. M., CASTAGNARO, A. P., VOJNOV, A. A. and MARANO, M. R. Biofilm Formation, Epiphytic Fitness, and Canker Development in *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. **Mol Plant Microbe Interact**, v.20, n.12, p. 22-30, 2007.

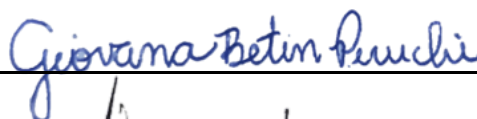
SCAPIN, M. S.; BEHLAU, F.; SCANDELA, L. H. M.; FERNANDES, R. S.; SILVA JUNIOR, G. J.; RAMOS, H. H. Tree-row-volume-based sprays of copper bactericide for control of citrus canker. **Crop Protection**, v. 77, p. 119-126, 2015.

SHI, Q.; FEBRES, V. J.; JONES, J. B.; MOORE, G. A. Responsiveness of different citrus genotypes to the *Xanthomonas citri* ssp. *citri*-derived pathogen-associated molecular pattern (PAMP) flg22 correlates with resistance to citrus canker, **Mol Plant Pathol**, v.16, n.5, p. 507-520, 2014.

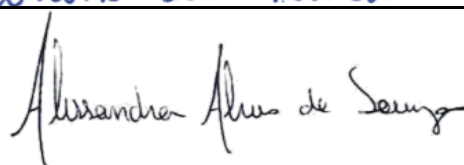
YRUELA, I. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. **Functional Plant Biology**, v. 36, n.5, p.409, 2005.

Win J, Chaparro-Garcia A, Belhaj K, *et al.* Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v.77, n. 2, p.35–47, 2012.

Discente: Giovana Betin Peruchi



Orientadora: Alessandra Alves de Souza



Coorientador: Gustavo Habermann

