



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LUCIANA MENEGUIM

**ESTUDOS DA REAÇÃO AO COBRE EM**  
*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*:  
**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE *IN VITRO* E**  
**TRANSFERÊNCIA CONJUGATIVA DE PLASMÍDEO ENVOLVIDO NA**  
**RESISTÊNCIA AO COBRE**

---

Londrina  
2007

**LUCIANA MENEGUIM**

**ESTUDOS DA REAÇÃO AO COBRE EM**  
***Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*:**  
**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE *IN VITRO* E**  
**TRANSFERÊNCIA CONJUGATIVA DE PLASMÍDEO ENVOLVIDO NA**  
**RESISTÊNCIA AO COBRE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador(a): Prof. Dr. Marcelo Giovanetti Canteri

Co-Orientador(a): Dr. Rui Pereira Leite Júnior

Londrina  
2007

**LUCIANA MENEGUIM**

**ESTUDOS DA REAÇÃO AO COBRE EM**  
***Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*:**  
**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE *IN VITRO* E**  
**TRANSFERÊNCIA CONJUGATIVA DE PLASMÍDEO ENVOLVIDO NA**  
**RESISTÊNCIA AO COBRE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Rui Pereira Leite Júnior – IAPAR

---

Prof. Dr. Hugo Bruno Correa Molinari – IAPAR

---

Profa. Dra. Débora Cristina Santiago – UEL

---

Prof. Dr. Sérgio Ruffo Roberto – UEL

---

Dra. Regina Vilas-Boas Campos Leite –  
EMBRAPA

---

Prof. Dr. Marcelo Giovanetti Canteri  
Orientador – UEL

Londrina, 26 de junho de 2007.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Moacyr e Terezinha, por todo o amor, carinho, dedicação, exemplo de otimismo e palavras de incentivo nos momentos mais difíceis.

## **OFEREÇO**

À minha irmã, pelo exemplo de determinação, pelo incentivo, apoio e principalmente, por ser a maior responsável por essa conquista.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pois sem Ele, nada é possível.

Ao Dr. Rui Pereira Leite Júnior por todos os ensinamentos, oportunidades, companheirismo, amizade e por ser um dos responsáveis por esta conquista.

Ao meu orientador Dr. Marcelo Giovanetti Canteri pela oportunidade de concluir mais esta etapa da minha formação.

Ao Dr. Hugo Bruno Molinari por todo incentivo e sugestões valiosíssimas para realização deste trabalho e principalmente, pela amizade.

Aos professores do Departamento de Agronomia pelos ensinamentos.

Ao meu marido Fred por todo amor e pelos momentos felizes que me proporciona e que sempre torce por mim.

À minha sogra Zelma pelo apoio em todas as minhas decisões.

Às minhas amigas de sempre Alice, Eliana, Flávia, Lázara, Michele, Rosângela e Viviani pelo apoio e pelas longas conversas.

Aos funcionários do Instituto Agrônomo do Paraná: Carlos “Polaco”, Eliana, Fátima, José Roberto, Naodi, Nelzinha e Nilcéia, pelo apoio técnico e pelos momentos de descontração.

À Cláudia, Luís, Michele e Viviani pela grande contribuição para a realização deste trabalho.

Às colegas do Laboratório de Biotecnologia do Iapar: Gislaine, Lucia, Luciana Grange e Sandra pela disponibilidade em ajudar sempre.

Ao pessoal que está hoje no Laboratório de Bacteriologia e Virologia do Iapar: Juzinha, Juliana Pistori, Liliane, Mayara, Michelle Buassi, Natália e Vanessa pela convivência saudável.

Aos colegas que passaram pelo Laboratório e que deixaram saudades: Carol, Daniela, Debora, Edgar, Fernanda, Franklin, Gabriel, Leandro, Leonar, Marquinho, Rafael, Vanessa Rossini, Viviane e Valmir.

Ao Dr. Celso Luiz Hohmann pelas longas conversas e incentivo.

Às colegas de pós-graduação: Lucimara, Marina, Michele, Tatiana e Viviani pelas reuniões “etílico-protéica-fitopatológicas”.

Ao Instituto Agronômico do Paraná pelas instalações e material cedidos para a realização do trabalho.

À Capes pela concessão da bolsa.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

“Amigos são anjos que nos deixam em pé quando nossas asas têm problemas em se lembrar como voar...”

Silene B. Ayubi

MENEGUIM, L. **Estudos da reação ao cobre em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: avaliação da sensibilidade e transferência conjugativa de plasmídeo envolvido na resistência ao cobre.** 2007. 64f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

## RESUMO

O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), é um dos problemas limitantes para a produção de citros em várias regiões do mundo. Produtos à base de cobre são comumente utilizados para controle de diversas doenças fúngicas e bacterianas, inclusive o cancro cítrico. No entanto, sua utilização pode levar à seleção de *Xac* resistente ao cobre. Os objetivos deste estudo foram verificar a presença de resistência ao cobre em *Xac* provenientes de diferentes Estados do Brasil e países da América do Sul, bem como verificar a ocorrência de transferência plasmidial, que confere resistência ao cobre, entre isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e *Xac*. Meio de cultura agar nutriente suplementado com sulfato de cobre, em diferentes concentrações, foi utilizado para determinar a sensibilidade ao cobre em *Xac*. Para verificar a transferência plasmidial, foi utilizado como doador o isolado 81-23 de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, resistente à 32 µg/ml de cobre. Esse isolado contém o plasmídeo autotransmissível pXvCu. O mutante do isolado 306 de *Xac*, sensível ao cobre e resistente à rifampicina, foi utilizado como receptor. A obtenção de transconjugantes foi feita em meio líquido, sólido e *in planta*. Plantas de laranja Valência foram inoculadas para confirmar a patogenicidade dos transconjugantes. A estabilidade plasmidial dos transconjugantes foi verificada por sucessivas repicagens em meio de cultura sem os agentes seletivos. A confirmação dos transconjugantes resistentes ao cobre foi verificada através do perfil plasmidial. Entre os 207 isolados de *Xac* avaliados não foi possível verificar a presença de resistência ao cobre, no entanto, houve variação quanto à tolerância ao cobre. A maior concentração de cobre em que houve crescimento bacteriano foi de 8 µg/ml de cobre para isolados de *Xac* provenientes de São Paulo, Argentina, Bolívia e Paraguai. Não foi possível verificar diferença quanto à procedência dos isolados e sua sensibilidade ao cobre. O plasmídeo que confere resistência ao cobre foi transferido para *Xac* a uma frequência variando de  $3 \times 10^{-3}$  a  $3 \times 10^{-4}$ , 0 a  $1,4 \times 10^{-5}$  e  $3,4 \times 10^{-4}$  a  $1,8 \times 10^{-5}$ , para conjugação em meio líquido, sólido e *in planta*, respectivamente. Foram obtidos transconjugantes com resistência ao cobre superior àquela do doador. A conjugação em meio líquido mostrou ser o método mais eficiente para transferência plasmidial. A patogenicidade a citros foi confirmada para todos os transconjugantes obtidos. A estabilidade dos transconjugantes foi determinada após 160 gerações de sucessivas repicagens em meio de cultura sem o agente seletivo. O presente estudo mostrou que ainda não há resistência ao cobre entre os isolados de *Xac* avaliados. Entretanto, a capacidade de transferência de plasmídeo com resistência ao cobre entre *X. campestris* pv. *vesicatoria* e *Xac* pode comprometer a eficiência do produto para o controle do cancro cítrico.

**Palavras-chave:** Transferência horizontal de genes. Plasmídeo autotransmissível. Transferência conjugativa. Genes de resistência.

MENEGUIM, L. **Studies on the reaction of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* to copper: sensibility *in vitro* and conjugative transfer of plasmid involved in copper resistance.** 2007. 64p. Dissertation (Master Degree in Agronomy) – Londrina State University, Londrina, 2007.

## ABSTRACT

Citrus canker, caused by the bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), is one of the limiting factors for citrus production around the world. Copper-based products are commonly used for control of several fungic and bacterial diseases in citrus, as well as citrus canker. However, the frequent use of copper can lead to selection of copper-resistant *Xac*. The objectives of this study were to verify the presence of copper-resistance in *Xac* isolated from different states of Brazil and countries of South America, as well as to verify the occurrence of plasmidial transfer, that confers resistance to copper, from strain of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* to *Xac*. Nutrient agar supplemented with copper sulphate, in different concentrations, was used to determine the sensibility to copper in *Xac*. To verify the plasmidial transfer, the strain 81-23 of *X. campestris* pv. *vesicatoria*, resistant to 32µg/mL of copper, containing a self-transmissible plasmid pXvCu was used as a donor. The 306-1 strain mutant of *Xac*, sensible to copper and resistant to rifampicin, was used as receptor. The obtaintion of transconjugants was done by conjugation in liquid and solid media, and *in planta*. Valencia orange nursery trees were inoculated to confirm the pathogenicity of the transconjugants. The plasmidial stability of the transconjugants was verified by successive transfers in culture media without the selective agents. The confirmation of the copper-resistant transconjugants was done by the exame of their plasmidial profile. Among the 207 isolates of *Xac* evaluated it was not possible to observe the presence of resistance to copper. However, there was a variation on copper tolerance. The higher concentration in which bacterial growth was observed was 8 µg/ml of copper for the isolates from Sao Paulo, Argentina, Bolivia and Paraguay. It was not possible to determine difference due to the geographical source of the isolates and the resistance to copper. The copper resistance plasmid was transferred to the isolate of *Xac* in a frequency ranging from  $3.0 \times 10^{-3}$  to  $3.0 \times 10^{-4}$ , 0 to  $1.4 \times 10^{-5}$  and  $3.4 \times 10^{-4}$  to  $1.8 \times 10^{-5}$ , for the conjugation in liquid media, solid media and *in planta*, respectively. Transconjugants had higher copper-resistance than the donor strain. The conjugation in liquid media was the most efficient method for plasmidial transference. The pathogenicity was confirmed for all the transconjugants obtained. The plasmidial stability was observed after 160 generations of successive transfers in culture media without the selective agent. The present study showed that, there is no copper-resistance among the evaluated strains. The copper-resistance plasmidial transference from *X. campestris* pv. *vesicatoria* to *Xac* was possible and can affect the copper efficiency for citrus canker control.

**Keywords:** Horizontal gene transfer. Self-transmissible plasmid. Conjugative transfer. Resistance.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1 IMPORTÂNCIA DA CITRICULTURA.....	14
2.2 O CANCRO CÍTRICO.....	15
2.2.1 Importância .....	15
2.2.2 Etiologia .....	16
2.2.3 Sintomatologia .....	17
2.2.4 Controle do Cancro Cítrico.....	18
2.3 RESISTÊNCIA AO COBRE EM BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS .....	19
2.4 TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL DE GENES EM BACTÉRIAS .....	21
<b>3 ARTIGO 1: AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA SENSIBILIDADE AO COBRE EM</b> <b><i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Citri</i></b> .....	24
Resumo.....	24
3.1 Introdução .....	25
3.2 Material e Métodos.....	26
3.2.1 Isolados bacterianos e condições culturais.....	26
3.2.2 Teste de sensibilidade ao cobre.....	26
3.3 Resultados .....	32
3.4 Discussão.....	32
<b>4 ARTIGO 2: TRANSFERÊNCIA CONJUGATIVA DE PLASMÍDEO ENVOLVIDO</b> <b>NA RESISTÊNCIA AO COBRE PARA <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv.</b> <b><i>Citri</i></b> .....	36
Resumo.....	36
4.1 Introdução.....	37
4.2 Material e Métodos.....	38
4.2.1 Isolados bacterianos, plasmídeos e condições culturais.....	38
4.2.2 Obtenção de transconjugantes .....	38
4.2.2.1 Conjugação em meio líquido.....	38
4.2.2.2 Conjugação em meio sólido .....	40

4.2.2.3 Conjugação <i>in planta</i> .....	40
4.2.3 Análise dos transconjugantes .....	41
4.2.3.1 Extração de DNA plasmidial.....	41
4.2.3.2 Eletroforese em campo pulsado (PFGE) .....	41
4.2.3.3 Inoculação dos transconjugantes em planta .....	42
4.2.3.4 Teste de estabilidade .....	42
4.3 Resultados .....	43
4.3.1 Obtenção de transconjugantes .....	43
4.3.2 Análise dos transconjugantes .....	45
4.3.2.1 Análise do perfil plasmidial .....	45
4.3.2.2 Eletroforese em campo pulsado (PFGE) .....	45
4.3.2.3 Patogenicidade dos transconjugantes .....	45
4.3.2.4 Teste de estabilidade .....	46
4.4 Discussão.....	50
<b>5 CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>53</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) (Hasse) Vauterin et al. (1995), é uma das mais importantes doenças para a citricultura mundial (STALL e SEYMOR, 1983; SCHUBERT et al., 2001). A doença ocorre endemicamente em diversas regiões do Sudoeste Asiático e em vários países da América. Na América do Sul, a bactéria está presente no Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai (FEICHTENBERGER et al., 1997; LEITE JUNIOR, 1990) e mais recentemente na Bolívia (BRAITHWAITE et al., 2002).

No Brasil, foi constatada pela primeira vez em 1957 no município de Presidente Prudente, Estado de São Paulo (BITANCOURT, 1957). Apesar dos esforços de erradicação, a bactéria foi disseminada rapidamente para outras regiões de São Paulo e também para outros Estados como Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina (AMARAL, 1957; BARBOSA et al., 2001; FEICHTENBERGER et al., 1997; MACIEL et al., 1998) e mais recentemente para Roraima (NASCIMENTO et al., 2003).

Nos últimos anos, o cancro cítrico alcançou proporções epidêmicas na Flórida, Estados Unidos, e levou à adoção de medidas drásticas para erradicação, com destruição de mais de 1,5 milhão de árvores cítricas em pomares comerciais e residenciais (GOTTWALD et al., 2002). Entretanto, em função dos recentes furacões ocorridos neste país, principalmente na península da Flórida, a bactéria foi disseminada para uma vasta área, tornando inviável sua erradicação. Com isso, o governo americano suspendeu o programa de erradicação da doença na Flórida (GOTTWALD e IREY, 2007).

No Brasil, programas de erradicação do cancro cítrico têm sido implementados no Estado de São Paulo desde a década de 50, com o objetivo de restringir a disseminação da bactéria *Xac*. No Paraná, foi adotado um programa de manejo integrado para prevenção e controle do cancro cítrico desde o final da década de 80 (LEITE JÚNIOR e MOHAN, 1990; LEITE JÚNIOR, 2000). Entre as práticas para o manejo integrado de cancro cítrico estão incluídas a produção de mudas sadias, plantio de cultivares de citros resistentes, instalação de quebra-ventos arbóreos, controle da larva-minadora-do-citros (*Phyllocnistis citrella*) e aplicações regulares de bactericidas cúpricos (LEITE JÚNIOR e MOHAN, 1990; GOTTWALD e TIMMER, 1995; LEITE JÚNIOR, 2000; FUNDECITRUS, 2005).

Produtos cúpricos constituem a base para o controle químico de diversas doenças bacterianas em plantas cultivadas, dentre elas o cancro cítrico (KOIZUMI, 1985; LEITE JÚNIOR e MOHAN, 1990; GOTTWALD et al., 2002). O cobre atua de forma a proteger o tecido vegetal da infecção e reduzir a população bacteriana na superfície foliar. Porém, para obter um controle adequado de doenças bacterianas são necessárias diversas aplicações do produto (STALL et al., 1980; LEITE JÚNIOR et al., 1987; GRAHAM, 2001). O uso prolongado de bactericidas cúpricos para o controle de cancro cítrico pode levar à ocorrência de linhagens da bactéria resistentes ao cobre. Resistência aos cúpricos tem sido reportada para espécies dos gêneros *Pseudomonas* (SUNDIN et al., 1989; COOKSEY, 1990; CAZORLA et al., 2002) e *Xanthomonas* (MARCO e STALL, 1983; ADASKAVEG e HINE, 1985; MINSAVAGE et al., 1990). Com relação à *Xac*, existem relatos da ocorrência de resistência ao cobre em linhagens bacterianas obtidas de viveiros que receberam aplicações regulares de produtos à base de cobre, na Argentina (CANTEROS, 1996).

Resistência ao cobre em bactérias fitopatogênicas tem sido associada à presença de genes localizados no cromossomo e principalmente em plasmídeos (BENDER e COOKSEY, 1986; BENDER et al., 1990; COOKSEY, 1990; LEE et al., 1994). Plasmídeos que contêm genes de resistência ao cobre normalmente são autotransmissíveis (STALL et al., 1986). A mobilização desses plasmídeos tem sido demonstrada em *X. campestris* pv. *vesicatoria* e outros patovares do gênero *Xanthomonas* e *Pseudomonas syringae* (STALL et al., 1986; BENDER e COOKSEY, 1986; BENDER et al., 1990). A homologia determinada por hibridizações e similaridade de seqüências nucleotídicas de genes de resistência ao cobre tem sido detectada entre patovares do gênero *Xanthomonas* e *Pseudomonas*. Isto sugere que estes genes são provavelmente provenientes de um ancestral evolutivo comum e que podem ter sido adquiridos por transferência horizontal (VOLOUDAKIS et al., 1993; LEE et al., 1994).

Sendo a aplicação de bactericidas cúpricos uma das principais medidas de controle do cancro cítrico e também de outras doenças bacterianas, os objetivos deste estudo foram examinar a presença de resistência ao cobre em *Xac* provenientes de diferentes Estados do Brasil e de outros países da América do Sul, bem como determinar o potencial da transferência plasmidial, que confere resistência ao cobre, de isolados de *X. campestris* pv. *vesicatoria* para *Xac*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 IMPORTÂNCIA DA CITRICULTURA

A produção mundial de citros é de aproximadamente 102 milhões de toneladas por ano, e é oriunda de uma extensa área cultivada, com 7,3 milhões de hectares (MATTOS JUNIOR et al., 2006). A produção e a área cultivada superam em grande parte outras frutas tropicais, subtropicais e temperadas, como banana, maçã, mamão, manga, pêra, pêssego e uva (MATTOS JUNIOR et al., 2006). O Brasil é o maior produtor mundial de citros, seguido dos Estados Unidos, que juntos produzem cerca de 45% da produção mundial. Destaca-se ainda nesse panorama a África do Sul, Espanha e Israel, com produções de laranjas e tangerinas para o mercado *in natura* e o México com a lima ácida Galego. Além disso, novos parques citrícolas estão se desenvolvendo na Ásia, principalmente na China (USDA, 2006).

No Brasil, foram processadas mais de 18 milhões de toneladas de laranja para produção de suco concentrado congelado no ano de 2006 e a sua exportação superou 1,3 milhões de toneladas (ABECITRUS, 2007). O faturamento com a exportação deu um salto de 31% em 2006 para US\$ 1,043 bilhão, apesar da queda de 6,74% no volume das exportações. Em 2005, os embarques renderam US\$ 796,132 milhões à indústria citrícola (ASSOCITRUS, 2007). No primeiro trimestre de 2007 a exportação de suco concentrado congelado registrou aumento de 67,90 %, ocasionado por problemas climáticos na Flórida, considerado o segundo maior parque citrícola do mundo (CNA, 2007).

## 2.2 O CANCRO CÍTRICO

### 2.2.1 Importância

O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xac*, representa séria e constante ameaça à citricultura mundial (CIVEROLO, 1984; VERNIÈRE et al., 1998; GOTTWALD et al., 2002). Apesar do elevado número de medidas impostas por muitos países no sentido de prevenir a introdução do cancro cítrico, a extensão geográfica da doença continua a aumentar. O agente causal tem sido disseminado pelo mundo, principalmente por meio de órgãos vegetais contaminados, estabelecendo-se endemicamente em países e ilhas banhados pelo Oceano Índico, nos países da Ásia Oriental, Oriente Médio, África, América do Sul e do Norte (KOIZUMI, 1985; LEITE JÚNIOR, 1990; ROMEIRO, 1995; BERGAMIN FILHO e KIMATI, 1995; FEICHTENBERGER, 1998). Em países como Austrália e Nova Zelândia, depois de introduzido, o cancro cítrico pôde ser erradicado (KOIZUMI, 1985). No Brasil, o primeiro relato de sua ocorrência foi em 1957 na região de Presidente Prudente, Estado de São Paulo (BITANCOURT, 1957).

O cancro cítrico é uma doença quarentenária para os principais países produtores de citros. Com isso, o comércio internacional impõe restrições à importação de produtos cítricos provenientes de países com ocorrência da doença, o que leva o Brasil e os Estados Unidos a adotarem medidas para excluir e erradicar o patógeno (STALL e CIVEROLO, 1991; GOTTWALD et al., 2001; SCHUBERT et al., 2001). Anualmente, milhões de dólares são gastos na prevenção, quarentena, em programas de erradicação e no controle da doença na Flórida, Estados Unidos. Nesse país, o programa de erradicação do cancro cítrico já gastou cerca de 1 bilhão de dólares em pesquisa, erradicação e indenização em mais de nove anos de campanha de erradicação da doença (GOTTWALD e IREY, 2007). Apesar de todo este esforço, os freqüentes furacões ocorridos no Estado da Flórida, os quais contribuem para a disseminação de *Xac*, fizeram com que a doença adquirisse proporções endêmicas tornando impraticável sua erradicação (GOTTWALD e IREY, 2007). Devido à disseminação da bactéria para várias localidades, as medidas de erradicação até então adotadas foram suspensas, entre elas a que determinava a

remoção de todas as árvores cítricas dentro de um raio de 579 m a partir do foco de infecção (GOTTWALD e IREY, 2007). Os esforços estão voltados para a implantação de melhores práticas de manejo para o cancro cítrico, visando diminuir as perdas na produção, mesmo convivendo com a doença. Isso também resultou em discussões a respeito da implantação de uma quarentena na Flórida, impedindo o embarque de frutos cítricos desse Estado para outros Estados produtores (GOTTWALD e IREY, 2007).

### 2.2.2 Etiologia

*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse) Vauterin et al. (1995), (Bactéria. Proteobacteria, Subdivisão Gamma, Xanthomonadales) pertence ao gênero *Xanthomonas*, apresenta reação Gram-negativa, respiração aeróbia, formato baciliforme e motilidade por um flagelo polar (monotríquia). Polissacarídeos extracelulares são produzidos pelas células bacterianas, ajudando na sua dispersão e sobrevivência (GOTO e HYODO, 1985). *Xac* cresce na maioria dos meios de cultura utilizados em laboratório e é facilmente isolada do tecido vegetal infectado. Colônias da bactéria são visíveis em meio de cultura sólido após 2-3 dias de incubação a 28 °C (ROSSETI, 1981).

Existem diferentes tipos de cancro cítrico, causados por diferentes patovares de *X. axonopodis*. Devido à similaridade entre os sintomas, a separação destas formas da doença é baseada em tipos de hospedeiro e outras características fenotípicas e genotípicas da bactéria (GABRIEL et al., 1989; FEICHTENBERGER et al., 1997). O cancro cítrico asiático ou cancrose A, causado por *X. axonopodis* pv. *citri* (Sin. *Xanthomonas citri*, *Xanthomonas campestris* pv. *citri*), afeta grande número de espécies de plantas da família Rutacea e está disseminado em muitas regiões da Ásia, África, Oceania e Américas, sendo o tipo mais importante e severo da doença (GABRIEL et al., 1989; FEICHTENBERGER et al., 1997). O cancro cítrico B ou cancrose B, causada pela estirpe B de *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*, afeta um menor número de hospedeiros que a cancrose A. É mais agressivo em limões verdadeiros (*Citrus limon*) e lima ácida 'Galego' (*Citrus aurantifolia*) e sua distribuição está restrita à Argentina, Paraguai e Uruguai (GABRIEL et al., 1989;

FEICHTENBERGER et al., 1997). A cancrose C ou cancrose do limoeiro ‘Galego’ causada pela estirpe C de *X. axonopodis* pv. *aurantifolii*, ocorre principalmente em lima ácida ‘Galego’ e está restrita a algumas regiões do Estado de São Paulo (GABRIEL et al., 1989; FEICHTENBERGER et al., 1997). A cancrose D, causada pela estirpe D de *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* não está muito bem caracterizada e foi relatada somente no México, causando lesões em folhas e ramos da lima ácida ‘Galego’ (GABRIEL et al., 1989; FEICHTENBERGER et al., 1997). A mancha bacteriana dos citros, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo*, tem patogenicidade limitada e ocorrência restrita à Flórida, afetando principalmente plantas do porta-enxerto citrumelo ‘Swingle’ (GABRIEL et al., 1989; FEICHTENBERGER et al., 1997).

A taxonomia relacionada ao gênero *Xanthomonas* é bastante controversa. Frequentemente, novas propostas de reclassificação são apresentadas levantando polêmicas e indefinições quanto à nomenclatura do agente causal do cancro cítrico (VAUTERIN et al., 1995; SCHAAD et al., 2000; BRUNINGS e GABRIEL, 2003; SCHAAD et al., 2005). O nome científico de *X. axonopodis* pv. *citri* é o atualmente aceito (VAUTERIN et al., 1995) e na literatura mundial a doença é referida como cancro cítrico Asiático, enquanto no Brasil, por ser a mais severa e principal forma de ocorrência, a doença é denominada simplesmente como cancro cítrico.

### **2.2.3 Sintomatologia**

O cancro cítrico ocorre em toda a parte aérea da planta cítrica, com sintomas característicos que podem variar em função do tipo e idade do órgão infectado pela bactéria. Inicialmente, na superfície de ramos, folhas e frutos jovens, aparecem lesões eruptivas, levemente salientes, puntiformes, de cor creme ou parda, as quais vão se tornando esponjosas, esbranquiçadas e pardacentas, algumas vezes circundadas por halo amarelo (LEITE JUNIOR, 1990; ROSSETTI, 2001).

Em folhas, as lesões se desenvolvem nas duas faces e de maneira saliente. O tamanho das lesões nas folhas depende muito da suscetibilidade do

hospedeiro, podendo atingir até 10 mm de diâmetro em cultivares suscetíveis de laranja e pomelo (STALL e SEYMOUR, 1983; LEITE JUNIOR, 1990). Quando as lesões são numerosas, a doença provoca a desfolha prematura de ramos, comprometendo o processo fotossintético, que por sua vez reflete em baixas produções e no depauperamento generalizado da planta (GOTTWALD et al., 1988; LEITE JUNIOR, 1990). Quando as lesões atingem grandes áreas podem provocar a morte de ramos (FEICHTENBERGER et al., 1997). Nos frutos, as lesões podem atingir a parte interna da casca e geralmente são maiores do que em folhas, apresentando fissuras no centro (LEITE JUNIOR, 1990; FEICHTENBERGER et al., 1997). Quando a quantidade de lesões é elevada, o desenvolvimento dessas lesões pode levar à queda dos frutos antes da maturação e prejudicar a qualidade dos frutos remanescentes na planta pela própria presença de lesões e/ou deformações (GOTTWALD et al., 2002; VERNIÈRE et al., 2003).

#### **2.2.4 Controle do Cancro Cítrico**

Nos Estados de São Paulo, Brasil, e Flórida, Estados Unidos, o controle do cancro cítrico baseia-se principalmente em medidas de exclusão e erradicação (SCHOULTIES et al., 1987; BARBOSA et al., 2001; GOTTWALD et al., 2001). No Brasil, programas de erradicação têm sido implementados no Estado de São Paulo desde a década de 50, para restringir a disseminação da bactéria *Xac* e eventualmente, eliminar a doença do território paulista (FEICHTENBERGER et al., 1997; LEITE JUNIOR, 1990).

No Estado do Paraná, tem sido adotado um programa de manejo integrado para prevenção e controle do cancro cítrico desde o final da década de 80 (LEITE JÚNIOR e MOHAN, 1990; LEITE JÚNIOR, 2000). Entre as práticas para o manejo integrado do cancro cítrico estão a produção de mudas saudáveis, plantio de cultivares resistentes à doença, instalação de quebra-ventos arbóreos, controle da larva-minadora-do-citros (*Phyllocnistis citrella*) e, aplicações regulares de bactericidas cúpricos (LEITE JUNIOR e MOHAN, 1990; GOTTWALD e TIMMER, 1995; LEITE JÚNIOR, 2000; FUNDECITRUS, 2005).

O cobre atua de forma a proteger o tecido vegetal da infecção e reduzir a população bacteriana na superfície foliar. A época e o número de aplicações de cobre para controle eficiente do cancro cítrico dependem de vários fatores como suscetibilidade do cultivar, idade da planta, condições ambientais e adoção de outras medidas de controle (LEITE JÚNIOR, 1990). A aplicação de produtos cúpricos é realizada principalmente durante o período de crescimento das plantas buscando a proteção de brotações novas (KUHARA, 1978; LEITE JUNIOR e MOHAN, 1990; CANTEROS, 2000; LEITE JUNIOR, 2000). Têm sido utilizados no controle de doenças bacterianas os produtos oxiclreto de cobre, sulfato tribásico de cobre, hidróxido de cobre e óxido cuproso (PEREIRA et al., 1981; MEDINA-URRUTIA e STAPLETON, 1985; LEITE JÚNIOR et al., 1987; McGUIRE, 1988).

Esses produtos constituem a base para o controle químico de diversas doenças bacterianas em plantas cultivadas, entre elas o cancro cítrico (KOIZUMI, 1985; LEITE JÚNIOR e MOHAN, 1990; GOTTWALD et al., 2002). Entretanto, são necessárias várias aplicações do produto para o controle adequado das doenças (STALL et al., 1980; LEITE JÚNIOR et al., 1987; GRAHAM, 2001). A utilização continuada desses produtos pode apresentar algumas desvantagens, como o acúmulo do metal no solo que pode causar fitotoxicidade e danos ambientais, além de selecionar populações bacterianas resistentes ao produto (ALVA et al., 1995; COOKSEY et al., 1990).

### **2.3 RESISTÊNCIA AO COBRE EM BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS**

Por décadas, os compostos cúpricos têm sido empregados no controle de doenças bacterianas e fúngicas. O uso contínuo de compostos à base de cobre favorece a seleção de genes de resistência a esses produtos entre bactérias saprofíticas e fitopatogênicas (COOKSEY et al., 1990; ANDERSEN et al., 1991; ROGERS et al., 1994).

O primeiro relato da resistência de bactéria fitopatogênica ao cobre foi feito por Marco e Stall (1983) em estirpes de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, provenientes de lavouras de tomate e pimentão, na Flórida, Estados Unidos. Desde então, a resistência a cúpricos tem sido reportada para vários

patovares de *Xanthomonas* spp. (ADASKAVEG e HINE, 1985; MINSAVAGE et al., 1990; CANTEROS, 1996; AGUIAR et al., 2000) e *Pseudomonas syringae* (BENDER e COOKSEY, 1986; SUNDIN et al., 1989; LEE et al., 1994; CAZORLA et al., 2002), inclusive em populações epífitas de *Pseudomonas* spp. (COOKSEY ET AL., 1990). No Brasil, resistência ao cobre foi verificada em *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* provenientes de pimentão e tomateiro (MARINGONE, 1986; AGUIAR et al., 2000).

Organismos eucariotos e procariotos requerem cobre para seu desenvolvimento normal. Esse elemento é um cofator essencial de inúmeras enzimas envolvidas na respiração, como as oxigenases e proteínas transportadoras de elétrons (GARCIA et al., 1994). Entretanto, em altas concentrações, ele torna-se tóxico às células, uma vez que tem a capacidade de formar radicais livres que danificam o DNA e a membrana lipídica da célula (HOSHINO et al., 1999; MULLER et al., 2000). Para atenuar a sensibilidade ao cobre, as bactérias desenvolveram sistemas de resistência a esse metal pesado. Entre os possíveis mecanismos de resistência incluem o seqüestro físico, exclusão e/ou efluxo e detoxificação (SUMMERS e SILVER, 1978). Os mecanismos de resistência encontrados nos plasmídeos são geralmente de efluxo, uma vez que eles podem ser rapidamente mobilizados em resposta a uma concentração tóxica do metal (SILVER e WALDERHAUG, 1992).

Em *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, genes de resistência ao cobre foram localizados em plasmídeos de 35 kb não conjugativos, como o pPT23D (BENDER e COOKSEY, 1986; COOKSEY, 1987). Em *X. campestris* pv. *vesicatoria* foram encontrados em plasmídeos conjugativos que podem variar de 188 a 200 kb, como o pXV10A e pXvCu, provenientes de isolados obtidos nos Estados de Oklahoma e Flórida, Estados Unidos, respectivamente (STALL et al., 1986; BENDER et al., 1990).

O primeiro e mais estudado sistema que confere resistência ao cobre em bactérias fitopatogênicas foi o do plasmídeo pPT23D de *P. syringae* pv. *tomato*. Esse plasmídeo apresenta o sistema *cop*, no qual os genes estão organizados em operon constituído por quatro genes, *copABCD*, sob controle de um promotor induzível por cobre (COOKSEY, 1987). Os genes *copA* e *copC* codificam proteínas periplasmáticas capazes de se ligar a íons cobre. O gene *copB* codifica uma proteína de membrana externa e o gene *copD* codifica uma proteína de membrana interna (CHA e COOKSEY, 1991).

Durante a fase de anotação dos genes no Projeto Genoma de *Xac*, foram encontrados alguns genes potencialmente envolvidos com a resistência ao cobre nessa bactéria (da SILVA et al., 2002). As ORFs (Open Read Frames) XAC3630 e XAC3631, presentes no DNA cromossomal de *X. axonopodis* pv. *citri*, apresentaram alta identidade com o gene *copA* e uma homologia significativa com o gene *copB*, respectivamente, da bactéria *P. syringae* pv. *tomato* (MELLANO e COOKSEY, 1988). Nenhuma homologia foi observada com os genes *copC* e *copD* da mesma bactéria (MELANO e COOKSEY, 1988). A presença dos genes *copA* e *copB* são necessários para a resistência ao cobre, enquanto os genes *copC* e *copD* são requeridos para uma resistência máxima em *P. syringae* pv. *tomato* (MELLANO e COOKSEY, 1988).

O desenvolvimento da resistência a bactericidas na comunidade bacteriana não requer evolução independente de resistência para cada estirpe ou espécie, mas a comunidade pode desenvolver resistência pela transferência horizontal de informação gênica entre isolados, patovares, espécies e gêneros (COOKSEY, 1990). A presença de genes homólogos de resistência ao cobre em *Xanthomonas* e *Pseudomonas* sugere a ocorrência da transferência horizontal de genes entre esses gêneros bacterianos. Vários trabalhos relatam a possibilidade de troca de genes por conjugação, para genes de resistência ao cobre presentes tanto no cromossomo como em plasmídeos (SUNDIM et al., 1989; BENDER et al., 1990; LEE et al., 1994; BASIM et al., 1999; NAKAJIMA et al., 2002).

## **2.4 TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL DE GENES EM BACTÉRIAS**

O genoma bacteriano é extremamente dinâmico na natureza. Uma grande quantidade de informações genéticas são inseridas ou deletadas do genoma através da transferência horizontal de genes (THG).

A THG pode ser definida como a transferência de um gene ou até mesmo grupo de genes entre organismos de diferentes espécies (DOOLITTLE, 1999). Apenas recentemente, a THG tem sido reconhecida como um importante fenômeno na troca de genes entre organismos. A primeira evidência da ocorrência de THG foi a descoberta de determinantes de virulência que poderiam ser

transferidos entre *Pneumococcus*, em ratos infectados (GRIFFITH, 1928). Fenômeno que mais tarde mostrou ser mediado pela tomada de material genético em um processo chamado transformação (GRIFFITH, 1928). THG é considerada a principal fonte de recombinação genética e consequente evolução bacteriana (OCHMAN et al., 2000; BROWN, 2003). Estudos genômicos comparativos têm proporcionado exemplos de eventos ligados à transferência horizontal (OCHMAN et al., 2000; PANOFF e CHUITON, 2004). Algumas vantagens seletivas, tais como resistência a antibióticos e metais pesados, são importantes no estabelecimento de populações portadoras desses genes transferidos (STALL et al., 1986; YANG et al., 1996). A transferência de informações genéticas ocorre frequentemente na natureza por processos denominados transformação, transdução e conjugação (TREVORS, 1999).

Transformação é definida como um processo de incorporação de DNA na forma livre, geralmente decorrente da lise celular. Na natureza, o processo ocorre quando uma célula sofre lise, liberando seu DNA. Este, por ser de grande tamanho tende a sofrer quebras, originando centenas de fragmentos de tamanhos variados. Como uma célula absorve poucos fragmentos, apenas uma pequena proporção de genes pode ser transferida. Inicialmente, para que o processo ocorra, é necessário que a célula seja competente, isto é, deve apresentar sítios de superfície para a ligação do DNA da célula doadora e apresentar a membrana em uma condição que permita a passagem deste DNA (TREVORS, 1999; SØRENSEN et al., 2005).

No processo de transdução, genes bacterianos são incorporados por bacteriófagos e transferidos para outra bactéria. A transdução pode ser generalizada, onde qualquer gene bacteriano pode ser transferido, ou especializada, onde somente genes localizados próximos ao sítio de integração do profago são transferidos (DAVISON, 1999). Bacteriófagos podem apresentar um número restrito de hospedeiro e algumas vezes são limitados a apenas uma única espécie bacteriana. No entanto, a transdução pode ocorrer entre diferentes espécies (DAVISON, 1999). Alguns bacteriófagos podem se manter na célula hospedeira como um plasmídeo, inclusive podem codificar genes de virulência (TREVORS, 1999; SØRENSEN et al., 2005).

A conjugação é a forma predominante na troca de informações genéticas entre espécies, gêneros e filos bacterianos (TURNER et al., 2002; van

ELSAS e BAILEY, 2002). A conjugação bacteriana é um processo altamente específico pelo qual o material genético é transferido da bactéria doadora para a receptora (SØRENSEN et al., 2005). Um importante pré-requisito para a transferência conjugativa é a íntima associação entre as superfícies celulares durante o contato entre as células. Esse contato físico é estabelecido por filamentos extracelulares denominados pili sexual (SØRENSEN et al., 2005). A maioria dos trabalhos relata a transferência de genes no ambiente por meio de conjugação, que ocorre através de plasmídeos conjugativos autotransmissíveis ou por pequenos plasmídeos, que apesar de não serem autotransmissíveis apresentam origem de transferência (*oriT*) que possibilitam sua transferência por plasmídeos autotransmissíveis (DAVISON, 1999).

Plasmídeos conjugativos têm sido encontrados em muitas bactérias fitopatogênicas, como por exemplo, plasmídeo R em *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* (BURR et al., 1988), plasmídeo CuR em *X. campestris* pv. *vesicatoria* (STALL et al., 1986; BENDER et al., 1990), plasmídeos Ti e Ri de *Agrobacterium* (PETIT et al., 1978), plasmídeos com resistência a metais pesados em *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *oortii* (HENDRICK et al., 1984). Resistência ao cobre em bactérias fitopatogênicas normalmente está relacionada a plasmídeos autotransmissíveis (BENDER e COOKSEY, 1986; STALL et al., 1986; BENDER et al., 1990; COOKSEY, 1990). No entanto, também pode estar localizado no cromossomo, como em *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* e *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (LIM e COOKSEY, 1993; LEE et al., 1994).

A mobilização de plasmídeos com resistência ao cobre tem sido demonstrada entre *X. campestris* pv. *vesicatoria*, patovares de *Xanthomonas axonopodis* e *P. syringae* (STALL et al., 1986; BENDER e COOKSEY, 1986; BENDER et al., 1989). A homologia determinada por hibridizações e similaridade de seqüências nucleotídicas de genes de resistência ao cobre têm sido detectadas entre patovares do gênero *Xanthomonas* e *Pseudomonas*, sugerindo que estes genes são provenientes de um ancestral evolutivo comum e que podem ter sido adquiridos por transferência horizontal (VOLOUDAKIS et al., 1993; LEE et al., 1994).

### **3 ARTIGO 1: AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA SENSIBILIDADE AO COBRE EM *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***

#### **Resumo**

O cancro cítrico, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), é um dos maiores problemas na produção de citros em diversas regiões do mundo. Entre as medidas adotadas para o controle dessa doença está a aplicação regular de bactericidas cúpricos. No entanto, a utilização freqüente desse produto pode levar à seleção de bactérias resistentes ao cobre. O objetivo desse estudo foi verificar *in vitro* a sensibilidade de isolados de *Xac* ao cobre. Foram examinados 207 isolados provenientes de plantas com cancro cítrico de diversos Estados do Brasil como Goiás, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e São Paulo e de outros países da América do Sul como Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai. Alíquotas de 5 µl de suspensões bacterianas foram depositadas em meio Agar Nutriente suplementado com cobre nas concentrações de 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 128 µg/ml. A concentração máxima de cobre em que ocorreu crescimento de *Xac* foi de 8 µg/ml para isolados provenientes do Estado de São Paulo, Argentina, Bolívia e Paraguai. Os resultados obtidos indicam que não há resistência ao cobre nas populações de *Xac* provenientes das regiões estudadas. No entanto, houve variação quanto à tolerância dos isolados para as diferentes concentrações de sulfato de cobre utilizados neste estudo.

Palavras-chave: cancro cítrico, sulfato de cobre, resistência

### 3.1 Introdução

O cancro cítrico, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) (Hasse) Vauterin et al. (1995), é um dos maiores problemas para a citricultura mundial (STALL e SEYMOR, 1983). A doença ocorre endemicamente em diversas regiões do Sudoeste Asiático e em vários países da América. Na América do Sul, a bactéria está presente no Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai (FEICHTENBERGER et al., 1997; LEITE JUNIOR, 1990) e mais recentemente na Bolívia (BRAITHWAITE et al., 2002).

No Brasil, foi constatada pela primeira vez em 1957 no município de Presidente Prudente, Estado de São Paulo (BITANCOURT, 1957). Apesar dos esforços iniciais, a bactéria foi disseminada rapidamente para outras regiões de São Paulo e também para os Estados do Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais (AMARAL, 1957; BARBOSA et al., 2001; FEICHTENBERGER et al., 1997; MACIEL et al., 1998) e mais recentemente para Roraima (NASCIMENTO et al., 2003).

Entre as medidas recomendadas para o controle da doença, os bactericidas cúpricos constituem a base do controle químico do cancro cítrico no Brasil e em outras partes do mundo (GOTTWALD et al., 2002). No entanto, o uso prolongado desses produtos pode levar à resistência de bactérias fitopatogênicas ao cobre (MARCO e STALL, 1983). O cobre atua de forma a proteger o tecido vegetal de infecção e reduzir a população bacteriana na superfície foliar. Entretanto, são necessárias várias aplicações do produto para alcançar um controle adequado de doenças bacterianas (STALL et al., 1980; LEITE JÚNIOR et al., 1987; GRAHAM, 2001).

O uso prolongado de bactericidas cúpricos para o controle de cancro cítrico pode também levar ao surgimento de linhagens da bactéria resistentes ao cobre. Resistência a cúpricos já foi reportada para patovares de *Pseudomonas syringae* (SUNDIN et al., 1989; CAZORLA et al., 2002) e *Xanthomonas* spp. (MARCO e STALL, 1983; ADASKAVEG e HINE, 1985; MINSAVAGE et al., 1990; AGUIAR et al., 2000). Com relação à Xac, há relatos da ocorrência de resistência ao cobre em linhagens bacterianas provenientes de viveiros que receberam aplicações regulares de produtos à base de cobre na Argentina (CANTEROS, 1996). No Brasil, estudos realizados com isolados provenientes de lavouras que receberam ou não

aplicações regulares de cobre por mais de 15 anos, mostraram a inexistência de *Xac* resistente ao produto (MACIEL et al., 1998; MENEGUIM et al, em publicação).

O objetivo deste estudo foi verificar e determinar *in vitro* a sensibilidade a diferentes concentrações de cobre de isolados de *Xac* provenientes de diversos Estados do Brasil e também de outros países da América do Sul.

## **3.2 Material e Métodos**

### **3.2.1 Isolados bacterianos e condições culturais**

Foram utilizados neste estudo 207 isolados de *Xac* pertencentes à coleção de bactérias fitopatogênicas do Laboratório de Bacteriologia e Virologia do Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR (Tabela 3.1). Isolados mantidos em tampão fosfato foram recuperados em meio Ágar Nutriente (AN) (SCHAAD, 2001) e mantidos a 28°C por 72 horas. Como fonte de cobre, foi utilizado sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) em diferentes concentrações, suplementado ao meio de cultura AN. O sulfato de cobre foi diluído em água destilada por agitação por 20 minutos e adicionado ao meio de cultura antes de sua autoclavagem a 121 °C por 20 minutos. O pH do meio foi ajustado para  $7,0 \pm 0,2$ , com hidróxido de sódio. As concentrações finais do íon cobre utilizadas foram 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 128 µg/ml.

### **3.2.2 Teste de sensibilidade ao cobre**

A massa bacteriana de cada isolado foi adicionada em tubo contendo 5 ml de água destilada esterilizada e a suspensão foi ajustada em espectrofotômetro para a concentração de  $10^8$  UFC/ml (DO 0,1 a 600 nm). Alíquotas de 5 µl da suspensão de cada isolado foram depositadas sobre o meio AN em triplicata nas diferentes concentrações de cobre. Em cada placa foram utilizados como controle os isolados 81-23 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e 306 de *Xac*, considerados como resistente ( $\text{Cu}^R$ ) e sensível ao cobre ( $\text{Cu}^S$ ), respectivamente. O isolado 81-23 de *X. campestris* pv. *vesicatoria* apresenta crescimento na presença de até 32 µg/ml de cobre (MARCO e STALL, 1986). A sensibilidade ou resistência ao cobre foi então avaliada determinando o crescimento bacteriano após 72 h de incubação das culturas a 28 °C (Figura 3.1).

Tabela 3.1 – Isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* utilizados neste estudo.

Isolado	Ano de isolamento	Local	Hospedeiro
<b>Brasil</b>			
<b>Goiás</b>			
12972	1996	Sancrelândia (=IBSBF 1241)	<i>Citrus sinensis</i>
<b>Mato Grosso</b>			
12974	2000	Cuiabá (=IBSBF 1498)	<i>Citrus sinensis</i>
<b>Minas Gerais</b>			
12351	1999	Frutal	<i>Citrus aurantifolia</i>
12975	2000	Frutal (= IBSBF 1504)	<i>Citrus sinensis</i>
<b>Rio Grande do Sul</b>			
12973	1999	Crissiumal (=IBSBF 1470)	<i>Poncirus trifoliata</i>
12976	1993	Palmeira das Missões (=IBSBF 999)	<i>Citrus sinensis</i>
12977	1994	Itaquiraí (=IBSBF 1049)	<i>Citrus sinensis</i>
14001	2001	Monte Negro	<i>Citrus sinensis</i>
14002	2001	Monte Negro	<i>Citrus sinensis</i>
14003	2001	Monte Negro	<i>Citrus sinensis</i>
14004	2001	Butiá	<i>Citrus sinensis</i>
14005	2001	Butiá	<i>Citrus sinensis</i>
14006	2001	Butiá	<i>Citrus sinensis</i>
<b>São Paulo</b>			
12333	1998	Valparaíso	<i>Citrus sinensis</i>
12335	1998	Ilha Solteira	<i>Citrus sinensis</i>
12336	1998	Valparaíso	<i>Citrus sinensis</i>
12337	1998	Valparaíso	<i>Citrus sinensis</i>
12338	1998	NI <sup>a</sup>	<i>Citrus sinensis</i>
12339	1998	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12341	1999	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12342	1999	Suzanópolis	<i>Citrus sinensis</i>
12344	1999	Andradina	<i>Citrus sinensis</i>
12345	1999	Castilho	<i>Citrus sinensis</i>
12347	1999	Suzanópolis	<i>Citrus sinensis</i>
12348	1999	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12350	1999	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12356	1999	Suzanópolis	<i>Citrus sinensis</i>
12358	1999	Suzanópolis	<i>Citrus sinensis</i>
12360	1999	Andradina	<i>Citrus reticulata</i>
12364	1999	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12366	1999	Suzanópolis	<i>Citrus sinensis</i>
12367	1999	Suzanópolis	<i>Citrus sinensis</i>
12413	1999	NI	<i>Citrus reticulata</i>
12419	1999	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12420	1999	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12426	1999	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12429	1999	Engenheiro Coelho	<i>Citrus sinensis</i>
12701	1999	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12702	1999	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12706	1999	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12708	1999	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12710	1999	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12711	1999	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12712	1999	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12713	1999	NI	<i>Citrus reticulata</i>
12714	1999	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12724	1999	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12763	2000	NI	<i>Citrus sinensis</i>

Continua

Continuação Tabela 3.1

<b>Isolado</b>	<b>Ano de isolamento</b>	<b>Local</b>	<b>Hospedeiro</b>
12775	2000	Guarantã	<i>Citrus sinensis</i>
12776	2000	Guarantã	<i>Citrus sinensis</i>
12777	2000	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12778	2000	Avaré	<i>Citrus sinensis</i>
12779	2000	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12792	2000	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12793	2000	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12794	2000	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12822	2000	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12823	2000	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12826	2000	NI	<i>Citrus reticulata</i>
12827	2000	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12828	2000	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12829	2000	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12830	2000	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12831	2000	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12833	2001	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12834	2001	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12835	2001	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12836	2001	Novo Horizonte	<i>Citrus sinensis</i>
12840	2001	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12841	2001	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12969	2001	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12978	2001	NI	<i>Citrus aurantifolia</i>
12979	2001	NI	<i>Citrus sinensis</i>
12980	2001	Assis	<i>Citrus spp.</i>
12981	2001	Assis	<i>Citrus spp.</i>
12982	2001	Borá	<i>Citrus spp.</i>
12984	2001	Echaporã	<i>Citrus spp.</i>
12986	2001	Paraguaçu Paulista	<i>Citrus spp.</i>
12987	2001	Paraguaçu Paulista	<i>Citrus spp.</i>
12988	2001	Platina	<i>Citrus spp.</i>
12989	2001	Platina	<i>Citrus spp.</i>
12990	2001	NI	<i>Citrus spp.</i>
12991	2001	Tarumã	<i>Citrus spp.</i>
12992	2001	Tarumã	<i>Citrus spp.</i>
12993	2001	Tarumã	<i>Citrus sinensis</i>
12995	2001	Nova Canaã Paulista	<i>Citrus sinensis</i>
12998	2001	Ilha Solteira	<i>Citrus reticulata</i>
12999	2001	Nova Canaã Paulista	<i>Citrus sinensis</i>
13000	2001	Salto Grande	<i>Citrus latifolia</i>
13001	2001	Salto Grande	<i>Citrus reticulata</i>
13002	2001	Salto Grande	<i>Citrus reticulata</i>
13003	2001	Salto Grande	<i>Citrus sinensis</i>
13005	2001	Aparecida D'Oeste	<i>Citrus sinensis</i>
13007	2001	Nova Canaã Paulista	<i>Citrus sinensis</i>
13008	2001	Aparecida D'Oeste	<i>Citrus sinensis</i>
13009	2001	Aparecida D'Oeste	<i>Citrus sinensis</i>
13010	2001	Aparecida D'Oeste	<i>Citrus sinensis</i>
13011	2001	Aparecida D'Oeste	<i>Citrus sinensis</i>
13012	2001	Aparecida D'Oeste	<i>Citrus sinensis</i>
13014	2001	Itápolis	<i>Citrus sinensis</i>
13015	2001	Itápolis	<i>Citrus sinensis</i>
13018	2001	Ourinhos	<i>Citrus sinensis</i>
13019	2001	Ourinhos	<i>Citrus sinensis</i>
13020	2001	Ourinhos	<i>Citrus sinensis</i>

Continua

Continuação Tabela 3.1

<b>Isolado</b>	<b>Ano de isolamento</b>	<b>Local</b>	<b>Hospedeiro</b>
13021	2001	Ourinhos	<i>Citrus sinensis</i>
13022	2001	Ourinhos	<i>Citrus sinensis</i>
13023	2001	Ourinhos	<i>Citrus aurantifolia</i>
13024	2001	Ourinhos	<i>Citrus sinensis</i>
13025	2001	Ourinhos	<i>Citrus sinensis</i>
13027	2001	Ourinhos	<i>Citrus aurantifolia</i>
13028	2001	Ourinhos	<i>Citrus sinensis</i>
13029	2001	Ourinhos	<i>Citrus aurantifolia</i>
13030	2001	Ourinhos	<i>Citrus sinensis</i>
13031	2001	Ourinhos	<i>Citrus aurantifolia</i>
13032	2001	Ourinhos	<i>Citrus sinensis</i>
13033	2001	Ourinhos	<i>Citrus aurantifolia</i>
13039	2001	Nova Canaã Paulista	<i>Citrus sinensis</i>
13056	2001	Salto Grande	<i>Citrus sinensis</i>
13057	2001	Ourinhos	<i>Citrus sinensis</i>
13058	2001	Ourinhos	<i>Citrus aurantifolia</i>
13060	2001	Ourinhos	<i>Citrus sinensis</i>
13061	2001	Ourinhos	<i>Citrus aurantifolia</i>
13062	2001	Ourinhos	<i>Citrus aurantifolia</i>
14042	2001	Guarantã	<i>Citrus sinensis</i>
14072	2002	Itápolis	<i>Citrus sinensis</i>
14076	2002	São Miguel Arcanjo	<i>Citrus sinensis</i>
14078	2002	Araraquara	<i>Citrus sinensis</i>
14079	2002	NI	<i>Citrus sinensis</i>
14110	2002	Jales	<i>Citrus sinensis</i>
<b>Argentina</b>			
12971	1993	(= IBSBF 413)	<i>Citrus paradisi</i>
14082	2002	Monte Carlo	<i>Citrus sinensis</i>
14083	2002	Monte Carlo	<i>Citrus sinensis</i>
14275	2003	NI	<i>Citrus sinensis</i>
14276	2003	NI	<i>Citrus sinensis</i>
14277	2003	NI	<i>Citrus sinensis</i>
14278	2003	NI	<i>Citrus sinensis</i>
14279	2003	NI	<i>Citrus sinensis</i>
14280	2003	NI	<i>Citrus sinensis</i>
14281	2003	NI	<i>Citrus sinensis</i>
14282	2003	NI	<i>Citrus sinensis</i>
14283	2003	NI	<i>Citrus sinensis</i>
14284	2003	NI	<i>Citrus sinensis</i>
14286	2003	NI	<i>Citrus sinensis</i>
14287	2003	NI	<i>Citrus sinensis</i>
14288	2003	NI	<i>Citrus sinensis</i>
14299	2004	NI	<i>Citrus sinensis</i>
14300	2004	NI	<i>Citrus sinensis</i>
14301	2004	NI	<i>Citrus sinensis</i>
14302	2004	NI	<i>Citrus sinensis</i>
14303	2004	Timbó	<i>Citrus sinensis</i>
14374	2005	San Miguel de Tucumán	<i>Citrus sinensis</i>
14375	2005	Salta	<i>Citrus sinensis</i>
14376	2005	Salta	<i>Citrus sinensis</i>
14377	2005	Salta	<i>Citrus sinensis</i>
14378	2005	Salta	<i>Citrus sinensis</i>
14379	2005	Salta	<i>Citrus sinensis</i>
14380	2005	Salta	<i>Citrus sinensis</i>
14381	2005	Salta	<i>Citrus sinensis</i>
14382	2005	Salta	<i>Citrus sinensis</i>

Continua

Continuação Tabela 3.1

<b>Isolado</b>	<b>Ano de isolamento</b>	<b>Local</b>	<b>Hospedeiro</b>
14383	2005	Salta	<i>Citrus sinensis</i>
14384	2005	Salta	<i>Citrus sinensis</i>
14385	2005	Salta	<i>Citrus sinensis</i>
14386	2005	La Rioja	<i>Citrus sinensis</i>
14387	2005	La Rioja	<i>Citrus sinensis</i>
14388	2005	La Rioja	<i>Citrus sinensis</i>
14389	2005	La Rioja	<i>Citrus sinensis</i>
14390	2005	La Rioja	<i>Citrus sinensis</i>
<b>Bolívia</b>			
12787	2000	Villa Tunari	<i>Citrus aurantifolia</i>
12788	2000	Villa Tunari	<i>Citrus</i> sp.
12790	2000	San Carlo	<i>Citrus sinensis</i>
12791	2000	NI	<i>Citrus sinensis</i>
<b>Paraguai</b>			
8946	1989	NI	<i>Citrus sinensis</i>
8947	1989	NI	<i>Citrus sinensis</i>
<b>Uruguai</b>			
12970	1993	NI (= IBSBF 422)	<i>Citrus paradisi</i>

<sup>a</sup>NI, não identificado

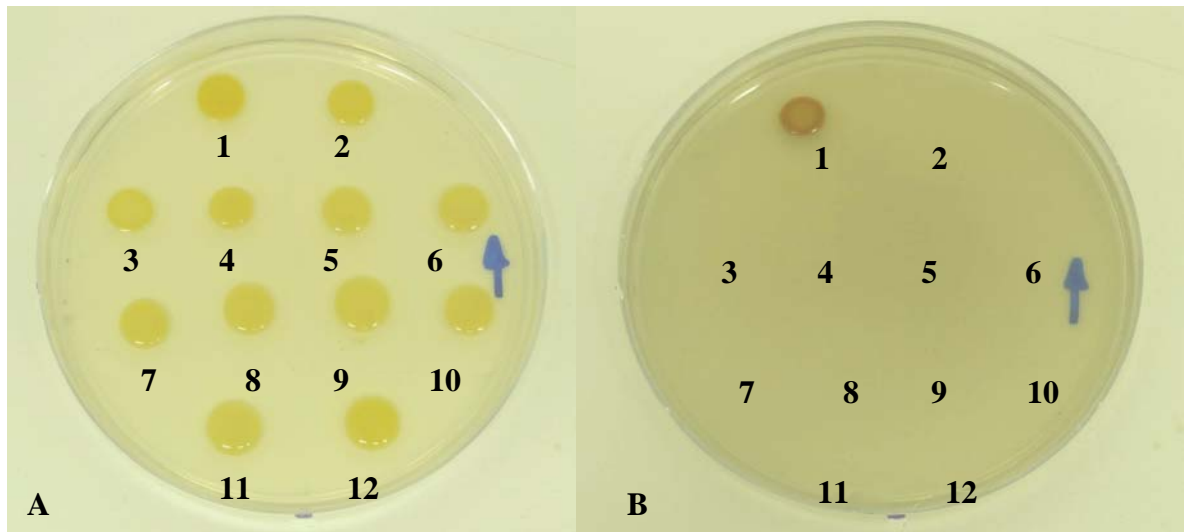


Figura 3.1. Avaliação da sensibilidade ao cobre de isolados bacterianos após 72 h de incubação a 28 °C, em meio de cultura AN suplementado com cobre nas concentrações de (A) 1 µg/ml e (B) 32 µg/ml. 1, isolado 81-23 de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Cu<sup>R</sup>); 2, 306 de *X. axonopodis* pv. *citri* (Cu<sup>S</sup>); 3 – 12, demais isolados de *Xac*.

### 3.3 Resultados

Não foi observada resistência ao cobre para os isolados de *Xac* provenientes de diferentes Estados do Brasil e de outros países da América do Sul. No entanto, houve variações quanto à tolerância ao cobre.

Entre os 207 isolados testados, todos foram sensíveis a concentrações superiores a 8 µg/ml de cobre (Tabela 3.2). O isolado 81-23 de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, utilizado como controle positivo para determinar resistência ao cobre, teve seu crescimento na concentração de 32 µg/ml de cobre (Figura 3.1).

Em relação à origem dos isolados analisados, somente 23 isolados do Estado de São Paulo apresentaram crescimento na concentração de 8 µg/ml de cobre (Tabela 3.2). Todos os demais isolados brasileiros cresceram somente na concentração até 4 µg/ml de cobre (Tabela 3.2). Apenas um isolado, proveniente do Estado de São Paulo, foi sensível à concentração de 2 µg/ml do cobre (Tabela 3.2). A maioria dos isolados testados foi tolerante às concentrações de até 4 µg/ml de cobre (Tabela 3.2). Quanto aos isolados dos demais países, seis isolados provenientes da Argentina, dois da Bolívia e dois do Paraguai, cresceram na concentração de 8 µg/ml de cobre (Tabela 3.2).

### 3.4 Discussão

Os resultados obtidos indicam que não há resistência ao cobre na população de *Xac* das regiões estudadas. A maior concentração de cobre em que houve crescimento de isolados de *Xac* foi de 8 µg/ml. Isto foi observado para isolados provenientes do Estado de São Paulo, Argentina, Bolívia e Paraguai. No entanto, houve variação quanto à tolerância dos isolados para as diferentes concentrações de cobre utilizadas neste estudo. Isolados provenientes do Estado de São Paulo foram os que apresentaram maior variação quanto à tolerância ao cobre, com crescimento bacteriano nas concentrações de 1 a 8 µg/ml de cobre. Resultados semelhantes foram obtidos em experimento realizado com isolados *Xac* provenientes de lavouras que receberam ou não aplicações regulares de cobre do Estado do Paraná (MENEGUIM et al., em publicação). A aplicação freqüente de produtos cúpricos para o controle de diversas doenças dos citros, pode ter levado à

Tabela 3.2 - Frequência (%) de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* com crescimento em diferentes concentrações de sulfato de cobre *in vitro*, obtidos de amostras coletadas em pomares de *Citrus* spp. de diversos Estados do Brasil e países da América do Sul.

Procedência	Nº de isolados	Cobre µg/ml								
		0	1	2	4	8	16	32	64	128
<b>Estado</b>										
Goiás	1	100 <sup>a</sup>	100	100	100	0	0	0	0	0
Mato Grosso	1	100	100	100	100	0	0	0	0	0
Minas Gerais	2	100	100	100	100	0	0	0	0	0
Rio Grande do Sul	8	100	100	100	100	0	0	0	0	0
São Paulo	148	100	100	99,3	93,9	15,5	0	0	0	0
<b>País</b>										
Argentina	38	100	100	100	97,4	15,8	0	0	0	0
Bolívia	6	100	100	100	100	33,3	0	0	0	0
Paraguai	2	100	100	100	100	100	0	0	0	0
Uruguai	1	100	100	100	100	0	0	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>207</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>99,5</b>	<b>94,7</b>	<b>15,9</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

<sup>a</sup>, Porcentagem de isolados que cresceram no meio de cultura com cobre

adaptação da população bacteriana ao cobre. A mesma situação também foi observada para outras bactérias do gênero *Xanthomonas* (MARCO e STALL, 1983).

Não foram encontradas diferenças evidentes quanto à sensibilidade ao cobre entre os isolados de *Xac* provenientes de diferentes regiões cítricas do Brasil e de outros países da América do Sul. Mesmo em regiões onde o cancro cítrico está presente há décadas quanto em regiões onde foi encontrado recentemente, como na Bolívia, não houve diferença em relação à sensibilidade ao cobre.

Os isolados de *Xac* provenientes do Estado de São Paulo, onde as medidas de controle do cancro cítrico adotadas são a exclusão e a erradicação da doença, apresentaram níveis de tolerância ao cobre semelhantes aos isolados provenientes de regiões onde a bactéria é controlada com aplicações regulares de cobre, como por exemplo, nos Estados do Paraná e Rio Grande do Sul (MACIEL et al., 1998; MENEGUIM, et al., em publicação).

Na Argentina, o cancro cítrico está presente desde 1975 (CANTEROS et al., 1985) e desde então, produtos à base de cobre são utilizados no controle da doença. No entanto, os isolados desse país, utilizados neste estudo, não apresentaram crescimento em concentrações superiores a 8 µg/ml de cobre (Tabela 3.2). Entretanto, CANTEROS (1996), relata a presença de isolados de *Xac* resistentes ao cobre na província de Corrientes, Argentina. Esses isolados foram provenientes de pomares que haviam recebido aplicações sucessivas de cobre. Por outro lado, isolados dessa bactéria obtidos de pomares que nunca tinham recebido pulverizações com cúpricos não apresentaram resistência a esse produto nesse país (CANTEROS, 1996). Talvez a sensibilidade ao cobre observada neste estudo para os isolados argentinos deve-se à região de sua procedência (Tabela 3.1).

O primeiro relato da presença de *Xac* na Bolívia foi feito em 2002, nos departamentos de Cochabamba e de Santa Cruz de La Sierra (BRAITHWAITE et al., 2002). Dois dos seis isolados testados cresceram na concentração de 8 µg/ml de cobre (Tabela 3.2). Apesar da recente introdução da bactéria do cancro cítrico na Bolívia, não houve diferença quanto ao comportamento da bactéria ao cobre, quando comparado com isolados de regiões onde o cancro cítrico já havia se estabelecido há mais tempo (Tabela 3.2).

O total de 207 isolados de *Xac* utilizado no presente estudo é relativamente grande quando comparado aos demais trabalhos relacionados a este

tipo de investigação e isto permitiu um estudo mais abrangente. Embora não tenha sido observada a presença de *Xac* resistente ao cobre, a utilização desse produto para o controle de outras doenças em citros pode favorecer a seleção de populações de *Xac* resistentes aos produtos cúpricos. Compostos cúpricos têm sido empregados no controle de doenças em plantas causadas por fungos e bactérias há mais de cem anos, entretanto, bactérias fitopatogênicas resistentes ao cobre têm se tornado prevalente (ADASKAVEG e HINE, 1985; BENDER e COOKSEY, 1986; BENDER e COOKSEY, 1987; COOKSEY et al., 1990; AGUIAR et al., 2000; NAKAJIMA et al., 2002).

O primeiro relato de bactérias fitopatogênicas resistente ao cobre foi feito por Marco e Stall (1983), em *X. campestris* pv. *vesicatoria* provenientes de lavouras de pimentão, na Flórida. Essa resistência em *Xanthomonas* spp. está normalmente associada à presença de plasmídeos, que apresentam dimensões grandes e são autotransmissíveis (STALL et al., 1986; BENDER et al., 1990). A associação de resistência ao cobre com esses tipos de plasmídeos tem sido relacionada com o aumento da ocorrência da resistência a esse metal pesado em bactérias fitopatogênicas no campo.

Vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar a resistência ao cobre em bactérias fitopatogênicas, como o controle da entrada de cobre e o seu manejo no interior da célula bacteriana como também, seqüestro do cobre por proteínas presentes no espaço periplasmático e na membrana externa da célula bacteriana (COOKSEY, 1993). No entanto, não se tem conhecimento de qual mecanismo está envolvido no processo de resistência ao cobre em *Xac*.

O presente estudo também mostrou que o cobre ainda é um produto seguro para ser utilizado no controle de cancro cítrico. Entretanto, sua aplicação freqüente pode levar à seleção de linhagens de *Xac* com maior tolerância ou até mesmo, resistência ao produto. E que a medida de controle adotada no Estado de São Paulo, onde se preconiza a erradicação da doença, aparentemente não tem interferido quanto à sensibilidade de *Xac* a compostos cúpricos. O nível de tolerância ao produto em isolados paulistas foi o mesmo observado para isolados do Estado do Paraná (MENEGUIM et al., em publicação), bem como outros Estados e países da América do Sul, onde se convive com a bactéria do cancro cítrico.

## 4 ARTIGO 2: TRANSFERÊNCIA CONJUGATIVA DE PLASMÍDEO ENVOLVIDO NA RESISTÊNCIA AO COBRE PARA *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

### Resumo

Produtos à base de cobre são comumente utilizados para controle de diversas doenças fúngicas e bacterianas, inclusive o cancro cítrico, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*). Resistência ao cobre em bactérias fitopatogênicas já foi relatada em diversos patovares de *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. No entanto, não há relatos de resistência ao cobre em *Xac* no Brasil. A resistência ao cobre pode ser adquirida por meio de transferência horizontal de genes (THG). A maioria dos genes que conferem resistência ao cobre estão presentes em plasmídeos e a THG por meio de conjugação plasmidial é um importante mecanismo de variabilidade genética. O objetivo deste estudo foi verificar a transferência do plasmídeo que confere resistência ao cobre em *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* para *Xac*. Para verificar a transferência plasmidial foi utilizado como doador o isolado 81-23 de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, resistente à concentração de 32 µg/ml de cobre, que contém o plasmídeo autotransmissível pXvCu, e como receptor o mutante da estirpe 306 de *Xac*, sensível ao cobre e resistente à rifampicina. Os transconjugantes foram obtidos por conjugação em meio líquido, sólido e *in planta*. A confirmação dos transconjugantes resistentes ao cobre foi feita pela determinação do perfil plasmidial. Plantas de laranja Valência foram inoculadas para confirmar a patogenicidade dos transconjugantes. A estabilidade plasmidial dos transconjugantes foi verificada por sucessivas repicagens em meio de cultura sem os agentes seletivos. O plasmídeo com resistência ao cobre foi transferido para *Xac* a uma frequência variando de  $3,0 \times 10^{-3}$  a  $3,0 \times 10^{-4}$ , 0 a  $1,4 \times 10^{-5}$  e  $3,4 \times 10^{-4}$  a  $1,8 \times 10^{-5}$ , para conjugação em meio líquido, sólido e *in planta*, respectivamente. Foram obtidos transconjugantes com resistência ao cobre superior àquela do doador. A conjugação em meio líquido mostrou ser o método mais eficiente para transferência plasmidial. A patogenicidade foi confirmada para todos os transconjugantes obtidos. A estabilidade dos transconjugantes foi determinada após 160 gerações de sucessivas repicagens em meio de cultura sem os agentes seletivos. Apesar da baixa frequência de transconjugantes obtidos, o presente estudo mostrou que a capacidade de transferência de plasmídeo com resistência ao cobre entre *X. campestris* pv. *vesicatoria* e *Xac* pode comprometer a eficiência do produto para o controle do cancro cítrico.

**Palavras-chave:** HTG, plasmídeo autotransmissível, transferência conjugativa, sulfato de cobre

## 4.1 Introdução

O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) (Hasse) Vauterin et al. (1995), é um dos principais problemas para a citricultura mundial (STALL e SEYMOR 1983; SCHUBERT et al., 2001). A aplicação de bactericidas à base de cobre é adotada como uma medida padrão para o controle químico do cancro cítrico em diversas regiões citrícolas ao redor do mundo (KOIZUMI 1985; LEITE JUNIOR e MOHAN, 1990). O cobre protege a planta cítrica e reduz a população bacteriana na superfície da folha, e aplicações regulares de bactericidas cúpricos são necessárias para se obter um controle adequado em hospedeiros suscetíveis (STALL et al., 1980). Apesar da utilização intensiva de produtos cúpricos para o controle de cancro cítrico, existe apenas um relato da presença de resistência ao cobre em populações de *Xac*, provenientes de viveiros, na Argentina (CANTEROS, 1996). Resistência a cobre já foi constatada em várias espécies de *Xanthomonas* (MARCO e STALL, 1983; ADASKAVEG e HINE, 1985; MINSAVAGE et al., 1990; GARDE e BENDER, 1991) e *Pseudomonas* (SUNDIN et al., 1989; SCHECK e PSCHIEDT, 1998; CAZORLA et al., 2002).

Embora genes cromossomais para resistência ao cobre tenham sido verificados em *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (LIM e COOKSEY, 1993; LEE et al., 1994), a maioria dos genes associados à resistência ao cobre em bactérias fitopatogênicas está relacionada a plasmídeos (BENDER e COOKSEY, 1986; BENDER et al., 1990; COOKSEY, 1990). Plasmídeos que contêm genes envolvidos na resistência ao cobre são normalmente autotransmissíveis (STALL et al., 1986). A mobilização de plasmídeos envolvidos na resistência ao cobre tem sido verificada entre patovares do gênero *Xanthomonas*, mas não para outros gêneros de bactérias fitopatogênicas (BENDER et al., 1990). Portanto, a associação de genes de resistência a cobre com plasmídeos autotransmissíveis pode ter contribuído para a disseminação dessa característica no decorrer dos anos.

O objetivo deste trabalho foi verificar o potencial de transferência horizontal de genes que conferem resistência ao cobre em isolados de *X. campestris* pv. *vesicatoria* resistente ao cobre para *Xac* sensível ao cobre.

## 4.2 Material e Métodos

### 4.2.1 Isolados bacterianos, plasmídeos e condições culturais

Os isolados bacterianos utilizados neste estudo estão listados na Tabela 4.1. Os isolados de *Xanthomonas* spp. e *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* foram cultivados em meio de cultura agar nutriente (AN) ou nutriente líquido (NL) (SCHAAD, 2001). O antibiótico rifampicina foi adicionado ao meio de cultura AN na concentração de 50 µg/ml. O isolado 81-23 de *X. campestris* pv. *vesicatoria* resistente ao cobre, foi mantido em meio de cultura AN suplementado com 32 µg/ml de íon cobre (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) (MARCO e STALL, 1983).

### 4.2.2 Obtenção de transconjugantes

Para o experimento de conjugação, foram utilizados os isolados 81-23 (Cu<sup>R</sup> e Rif<sup>S</sup>) de *X. campestris* pv. *vesicatoria* como doador e o isolado mutante 306-1 (Cu<sup>S</sup> e Rif<sup>R</sup>) de *Xac* como receptor. O mutante de *Xac* resistente ao antibiótico rifampicina, foi selecionado após plaqueamento de 100 µl de suspensão bacteriana contendo 10<sup>8</sup> UFC/ml sobre o meio de cultura AN acrescido de 50 µg/ml de rifampicina.

#### 4.2.2.1 Conjugação em meio líquido

Os isolados doador e receptor foram cultivados em 5 ml de NL por 16 h a 28 °C sob agitação de 120 rpm. Após esse período, 750 µl das culturas foram misturados e centrifugados por 15 min a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100 µl de água destilada autoclavada. Cinquenta microlitros da mistura foram transferidos para erlenmeyer de 100 ml, contendo 50 ml de NL e mantido sob agitação por 16 horas a 28 °C em rotação de 120 rpm. Após esse período, foram preparadas diluições seriadas apropriadas em água destilada esterilizada e alíquotas de 100 µl da suspensão foram plaqueadas em meio de cultura AN contendo cobre e rifampicina. As placas foram mantidas a 28 °C até o desenvolvimento de colônias.

Tabela 4.1 - Isolados bacterianos utilizados neste estudo.

<b>Isolado</b>	<b>Características relevantes<sup>a</sup></b>	<b>Fonte<sup>b</sup></b>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>		
306	Cu <sup>s</sup> MIC 8 µg/ml	IAPAR
306-1	Rif <sup>r</sup> Cu <sup>s</sup> MIC 8 µg/ml	IAPAR
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>		
81-23	Rif <sup>s</sup> Cu <sup>r</sup> MIC 32 µg/ml	RES
<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>		
SW2	Presença de 13 plasmídeo	IAPAR

<sup>a</sup> Todas as concentrações referem-se ao íon cobre proveniente de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O

<sup>b</sup> IAPAR, Instituto Agronômico do Paraná, Laboratório de Bacteriologia e Virologia; RES, R. E. Stall, University of Florida, Gainesville

#### 4.2.2.2 Conjugação em meio sólido

Para a conjugação em meio sólido, os isolados doador e receptor foram cultivados em 5 ml de meio NL por 16 h a 28 °C sob agitação de 120 rpm. Após esse período, 750 µl das culturas foram misturados em tubo de microcentrífuga e centrifugados por 15 min a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 100 µl de água destilada autoclavada e 50 µl da mistura foram depositados em placa contendo AN e mantida por 24 horas a 28 °C. Após esse período, a cultura foi removida da placa e ressuspensa em 1 ml de NL e então foram preparadas diluições apropriadas em água destilada esterilizada e alíquotas de 100 µl da suspensão foram plaqueadas em meio de cultura AN contendo cobre e rifampicina. As placas foram mantidas a 28 °C até o desenvolvimento de colônias.

#### 4.2.2.3 Conjugação *in planta*

Tanto o isolado doador como o receptor foram cultivados em 5 ml de NL por 16 h a 28 °C sob agitação de 120 rpm. Após esse período, 750 µl das culturas foram misturados em tubo de microcentrífuga e centrifugados por 15 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 ml de água destilada autoclavada. A suspensão contendo a mistura bacteriana foi infiltrada em folhas jovens de laranja Valência (*Citrus sinensis* (L) Osbeck.). Após os períodos de 24, 48 e 72 horas, 1 cm do tecido foliar inoculado foi macerado em 1,5 ml de água destilada autoclavada. Foram realizadas diluições seriadas apropriadas em água destilada esterilizada e 100 µl da suspensão foi plaqueada em placas contendo meio de cultura AN com cobre e rifampicina. As placas foram mantidas a 28 °C até o desenvolvimento de colônias.

Para determinar a ocorrência de mutações espontâneas, 100 µl de suspensão de cada isolado (doador e receptor) na concentração de  $10^8$  UFC/ml foi plaqueada em meio de cultura AN contendo cobre e rifampicina. A frequência de conjugação foi calculada pelo número de possíveis transconjugantes obtido por célula doadora (CURTIS, 1981).

### **4.2.3 Análise dos transconjugantes**

#### **4.2.3.1 Extração de DNA plasmidial**

Isolados bacterianos foram crescidos em tubos contendo 5 ml de meio NL a 28 °C por 12 horas a 120 rpm. As suspensões bacterianas foram ajustadas para a concentração de  $10^8$  UFC/ml e o DNA plasmidial foi extraído pelo método de lise alcalina (KADO e LIU, 1981). O DNA plasmidial foi submetido à eletroforese (5 V/cm) em gel de agarose (0,7%) em tampão Tris ácido acético EDTA 1X (TAE), corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e fotografado pelo sistema KODAK EDAS 120 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EUA). Em cada gel, DNA plasmidial de *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (SW2) foi incluída como marcador de peso molecular (COPLIN et al., 1981).

#### **4.2.3.2 Eletroforese em campo pulsado (PFGE)**

DNA genômico total das bactérias doadora, receptora e dos transconjugantes putativos foi preparado seguindo o protocolo descrito por Cooksey e Graham (1989) e Egel et al., (1991). Os blocos preparados com agarose de baixo ponto de fusão (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suécia), contendo as células bacterianas lisadas foram seccionados em pedaços de 1 a 2 mm. As seções foram lavadas três vezes com 200 µl de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) por 45 minutos cada. Após as lavagens, foram adicionados 200 µl do tampão da enzima de restrição *Xba*I na concentração de 1X. Após 15 minutos, o tampão da enzima e 30 U da enzima endonuclease de restrição *Xba*I foi adicionado em cada tubo. O DNA foi digerido por 12 horas a 37 °C. Após esse período, 500 µl de solução de lise sem proteinase K (N-Lauryl-sarcosyl 1% [p/v], EDTA 0,5 mM, pH 9,0) foi adicionado e os tubos foram novamente mantidos em banho maria a 50 °C por duas horas. A solução foi trocada e os tubos foram novamente mantidos por 2 horas em temperatura ambiente.

Os blocos de agarose contendo DNA genômico digerido foram colocados em poços de gel de agarose (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) 1,2 % preparado com tampão TBE 0,5 X (0,45 mM Tris, 45 mM ácido bórico, 1 mM de EDTA, pH 8,0). Os poços foram selados com agarose de baixo ponto de fusão a 1 % preparado com tampão TBE 0,5 X a 55 °C. O gel foi então colocado em equipamento Gene-Navigator (Pharmacia, Uppsala, Suécia), contendo

aproximadamente 2,5 l de tampão TBE 0,5X refrigerado a 10 °C. Os tempos de pulsos para a corrida eletroforética foram de 4 segundos por 1 hora e 15 segundos por 22 horas a 185 V (14,8 V/cm). O gel foi corado com tampão TBE 0,5X contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml) por 15 minutos, descorado em tampão TBE 0,5X minutos e fotografado pelo sistema KODAK EDAS 120 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EUA).

#### **4.2.3.3 Inoculação dos transconjugantes em planta**

Massa bacteriana dos transconjugantes putativos, bem como do isolado doador e selvagem de *Xac*, cultivados em meio de cultura AN contendo cobre e rifampicina, AN e rifampicina e AN, respectivamente, foi diluída em água destilada esterilizada e a suspensão ajustada na concentração de 10<sup>4</sup> UFC/ml. A suspensão bacteriana foi inoculada em folhas jovens de plantas de laranja Valência com auxílio de seringa hipodérmica de 1 ml. As plantas foram mantidas em câmara úmida por 24 horas em casa-de-vegetação. Após o desenvolvimento dos sintomas de cancro cítrico, foi realizado o reisolamento da bactéria em meio de cultura seletivo. Tecido foliar das plantas inoculadas com os transconjugantes foi desinfestado superficialmente com álcool 70%, hipoclorito de sódio 1% e lavado em água destilada esterilizada. O tecido foi triturado com auxílio de bisturi e a suspensão foi plaqueada em meio de cultura AN contendo cobre e rifampicina. As placas foram mantidas a 28 °C por 72 horas para verificar o desenvolvimento de colônias.

#### **4.2.3.4 Teste de estabilidade**

O teste de estabilidade da resistência ao cobre foi realizado *in vitro* com transconjugante putativo. Inóculo bacteriano crescido em meio de cultura AN contendo cobre e rifampicina nas concentrações de 32 µg/ml e 50 µg/ml, respectivamente, foi ressuspendido em água destilada autoclavada e ajustado para concentração de 10<sup>8</sup> UFC/ml. Alíquota de 100 µl foi inoculada em 25 ml de nutriente líquido (NL) sem os agentes seletivos. As células foram incubadas a 28 °C sob agitação de 120 rpm por 24 horas (cerca de 8 gerações). Após cada período de incubação de 24 horas, 100 µl da cultura foi inoculada em um novo frasco contendo 25 ml de meio NL e 100 µl foi plaqueado em meio AN contendo cobre e

rifampicinas concentrações de 32 µg/ml e 50 µg/ml, respectivamente. As placas foram mantidas a 28 °C por 72 horas para verificar o desenvolvimento bacteriano.

### 4.3 Resultados

#### 4.3.1 Obtenção de transconjugantes

Quando o isolado 81-23 (Rif<sup>s</sup> Cu<sup>I</sup>) de *X. campestris* pv. *vesicatoria* foi submetido à conjugação com o isolado 306-1 (Rif<sup>r</sup> Cu<sup>S</sup>) de *Xac*, em meio líquido, sólido e *in planta*, transconjugantes putativos desenvolveram em meio AN contendo cobre e rifampicina nas concentrações de 32 µg/ml e 50 µg/ml, respectivamente.

A frequência de transconjugantes obtida pelos métodos de conjugação em meio líquido, sólido e *in planta* variou de  $3,0 \times 10^{-3}$  a  $3,0 \times 10^{-4}$ , 0 a  $1,4 \times 10^{-5}$  e  $3,4 \times 10^{-4}$  a  $1,8 \times 10^{-5}$ , respectivamente. O método de conjugação em meio líquido foi o que apresentou o maior número de transconjugantes por célula doadora, quando comparado aos demais métodos, mostrando ser um eficiente método de transferência de plasmídeo.

Para a conjugação realizada *in planta*, foram obtidos transconjugantes putativos somente nos reisolamentos feitos após 24 e 48 horas após a inoculação das culturas. No entanto, não houve diferença quanto à frequência de transconjugantes obtidos nos dois períodos.

Para todos os métodos, os transconjugantes putativos desenvolveram em placas contendo cobre e rifampicina cinco dias após a conjugação. Entretanto, para o método *in planta*, alguns transconjugantes somente foram observados dez dias após o reisolamento.

Foram obtidos 27 transconjugantes que se desenvolveram em meio de cultura contendo cobre e rifampicina (Tabela 4.1). Vinte e dois transconjugantes escolhidos aleatoriamente foram repicados em meio de cultura AN contendo 64 e 128 µg/ml de cobre (Tabela 4.1). Destes, apenas os transconjugantes 306-1.14, 306-1.17 e 306-1.18, não cresceram na concentração de 128 µg/ml (Tabela 4.1). Essas concentrações de cobre são maiores que a concentração na qual

o isolado doador se desenvolve. Transconjugantes putativos selecionados para análises foram mantidos em meio de cultura AN contendo os agentes seletivos.

Tabela 4.1. Caracterização plasmidial, patogênica e de resistência ao cobre de transconjugantes obtidos da conjugação entre o isolado 81-23 de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Cu<sup>R</sup>) e 306-1, mutante de *X. axonopodis* pv. *citri* (Rif<sup>R</sup>).

Transconjugante	Característica				
	Plasmídeo <sup>a</sup>	Patogenicidade <sup>b</sup>	Reisolamento <sup>d</sup>	Cobre (µg/ml) <sup>e</sup>	
				64	128
306-1.1	+	+	+	+	+
306-1.2	+	+	+	+	+
306-1.8	-	+	+	+	+
306-1.12	+	+	+	+	+
306-1.13	+	+	+	+	+
306-1.14	+	+	-	+	-
306-1.15	-	+	+	+	+
306-1.16	-	+	+	+	+
306-1.17	-	+	-	+	-
306-1.18	-	Nt <sup>c</sup>	Nt	+	-
306-1.19	-	Nt	Nt	Nt	Nt
306-1.20	-	Nt	Nt	Nt	Nt
306-1.21	-	Nt	Nt	Nt	Nt
306-1.22	-	Nt	Nt	Nt	Nt
306-1.23	-	Nt	Nt	Nt	Nt
306-1.24	-	Nt	Nt	+	+
306-1.25	-	Nt	Nt	+	+
306-1.26	-	Nt	Nt	+	+
306-1.27	-	Nt	Nt	+	+
306-1.28	-	Nt	Nt	+	+
306-1.29	-	Nt	Nt	+	+
306-1.30	-	Nt	Nt	+	+
306-1.31	-	Nt	Nt	+	+
306-1.32	-	Nt	Nt	+	+
306-1.34	-	Nt	Nt	+	+
306-1.35	-	Nt	Nt	+	+
306-1.36	-	Nt	Nt	+	+

<sup>a</sup> +, observada a presença de plasmídeo que confere resistência ao cobre; -, não observada a presença de plasmídeo que confere resistência ao cobre

<sup>b</sup> +, presença de sintomas de cancro cítrico em folhas de laranja Valência

<sup>c</sup> Nt, não testado

<sup>d</sup> +, presença de desenvolvimento bacteriano após reisolamento em meio de cultura AN, contendo cobre (32 µg/ml) e rifampicina (50 µg/ml); -, ausência de desenvolvimento bacteriano após reisolamento em meio de cultura AN, contendo cobre (32 µg/ml) e rifampicina (50 µg/ml)

<sup>e</sup> +, presença de desenvolvimento bacteriano; -, ausência de desenvolvimento bacteriano

### 4.3.2 Análise dos transconjugantes

#### 4.3.2.1 Análise do perfil plasmidial

O perfil plasmidial dos transconjugantes foi comparado com o perfil plasmidial do doador e do receptor (Figura 4.1). O isolado 81-23 de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, utilizado como doador, apresenta um mega plasmídeo de aproximadamente 200 kb, designado pXvCu (STALL et al., 1986). O isolado selvagem 306 de *Xac* apresenta dois plasmídeos de aproximadamente 33 e 64 kb (da SILVA et al., 2002). No entanto, para alguns dos transconjugantes foram observados plasmídeos de aproximadamente 64 e 97 Kb (Figura 4.1), isso pode ser devido à co-integração entre os plasmídeos (AZEVEDO, 1998).

Foi realizada a extração plasmidial dos 27 transconjugantes. No entanto, foi possível verificar o mesmo perfil plasmidial do doador e do receptor em apenas cinco dos transconjugantes (Figura 4.1). A ausência do plasmídeo que confere resistência ao cobre nos demais transconjugantes, pode ser devido à dificuldade em extrair plasmídeos de alto peso molecular (Figura 4.1). Entretanto, todos os transconjugantes foram capazes de crescer em meio de cultura contendo os agentes seletivos, indicando que deve ter ocorrido a transferência dos genes responsáveis pela resistência ao cobre.

#### 4.3.2.2 Eletroforese em campo pulsado (PFGE)

A diversidade genética entre os isolados de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, *Xac* e dos transconjugantes foi determinada por meio dos perfís dos fragmentos do DNA genômico obtidos pela digestão com a enzima *Xba*I.

Foi possível observar diferenças nos perfís genômicos entre os isolados doador, receptor, selvagem e transconjugantes (Figura 4.2). Os perfís dos transconjugantes foram semelhantes ao perfil dos isolados receptor e selvagem (Figura 4.2). No entanto, quando comparados os perfís dos transconjugantes com o perfil do doador foi possível verificar que são distintos (Figura 4.2).

#### 4.3.2.3 Patogenicidade dos transconjugantes

Nove transconjugantes foram inoculados para confirmar sua patogenicidade para citros. Não foram observadas diferenças quanto às características dos sintomas causados pelos transconjugantes e o mutante quando comparado aos sintomas causados pelo isolado selvagem de *Xac* (Tabela 4.1). As

lesões foram observadas a partir do quinto dia da inoculação para todos os isolados inoculados.

Após o desenvolvimento dos sintomas, foi realizado o reisolamento dos transconjugantes. Apenas dois dos transconjugantes não se desenvolveram no meio de cultura AN contendo cobre e rifampicina nas concentrações de 32 µg/ml e 50 µg/ml, respectivamente (Tabela 4.1; Figura 4.3).

#### **4.3.2.4 Teste de estabilidade**

A estabilidade quanto à resistência ao cobre foi verificada para o transconjugante putativo 306-1.12. Após 160 gerações, o transconjugante foi capaz de se desenvolver a partir de transferências do meio de cultura NL sem os agentes seletivos para meio de cultura AN contendo cobre e rifampicina nas concentrações de 32 µg/ml e 50 µg/ml, respectivamente.

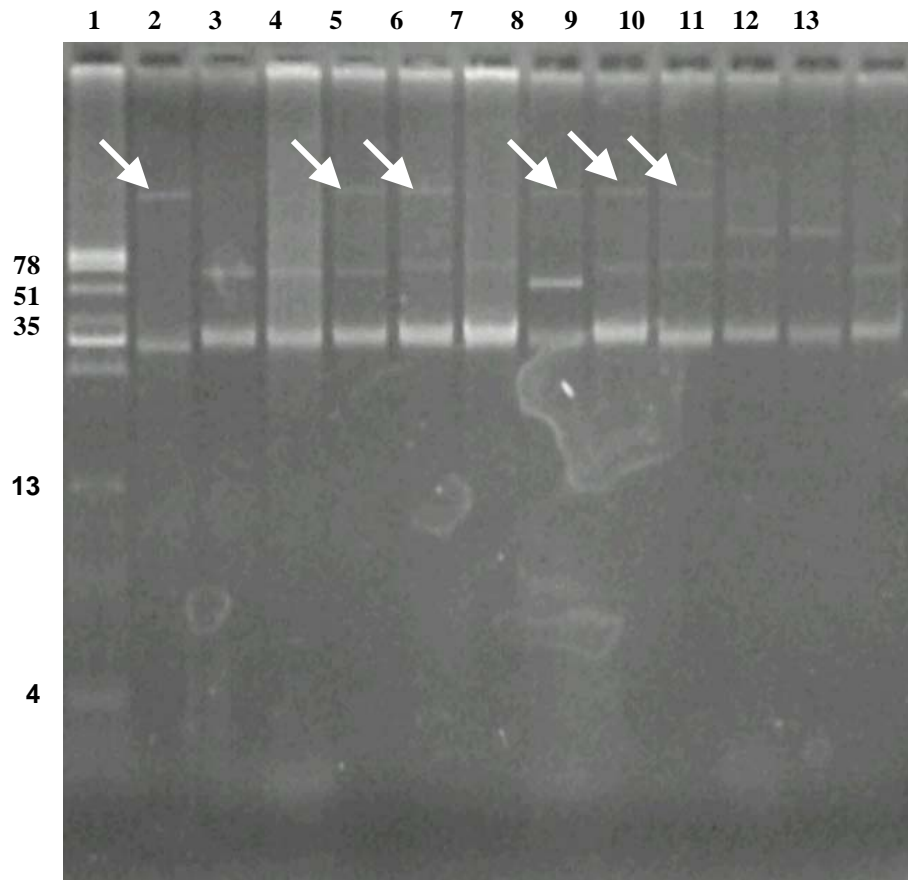


Figura 4.1. Perfil plasmidial dos isolados doador de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, receptor e selvagem de *X. axonopodis* pv. *citri* e dos transconjugantes. Linha 1: plasmídeos de *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (SW2) utilizado como marcador; 2, doadora (81-23); 3, receptora (306-1); 4, selvagem (306); 5, 306-1.1; 6, 306-1.2; 7, 306-1.8; 8, 306-1.12; 9, 306-1.13; 10, 306-1.14; 11, 306-1.15; 12, 306-1.16 e 13, 306-1.17 transconjugantes. A seta indica a presença do plasmídeo de 200 kb.

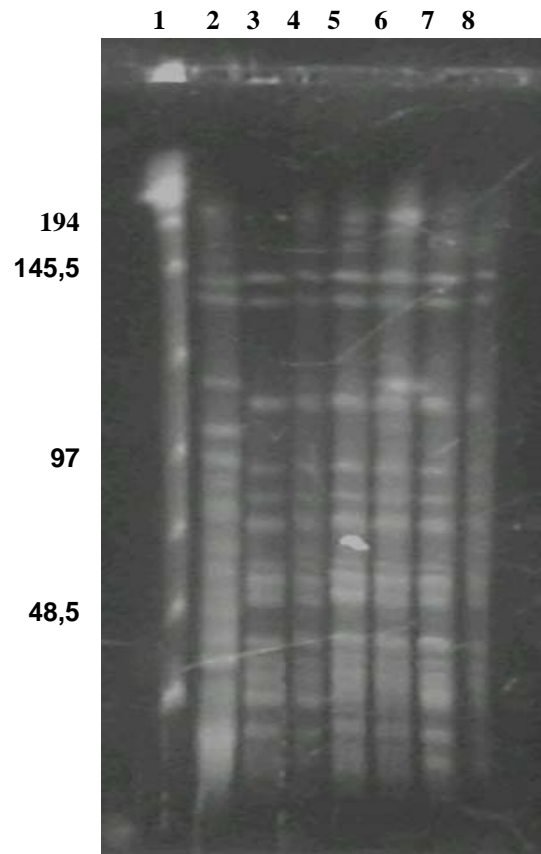


Figura 4.2. Perfil de restrição após PFGE após digestão do DNA genômico com a enzima *Xba*I dos isolados doador de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, receptor, selvagem *X. axonopodis* pv. *citri* e dos transconjugantes. Gel de eletroforese em campo pulsado por 1 h a 4 s e 22 h a 15 s, 185 V. Linha 1: DNA phago  $\lambda$  utilizado como marcador; 2, doadora (81-23); 3, receptora (306-1); 4, selvagem (306); 5, 306-1.14; 6, 306-1.17; 7, 306-1.25 e 8, 306-1.8, transconjugantes.

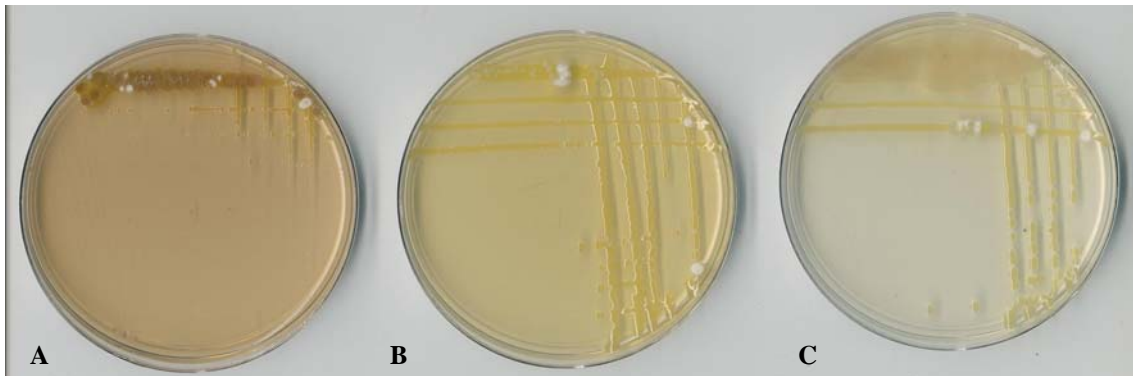


Figura 4.3. Reisolamento de transconjugante putativo em meio cultura. A, AN, Cobre e Rifampicina nas concentrações de 32  $\mu\text{g/ml}$  e 50  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente; B, AN e Rifampicina na concentração de 50  $\mu\text{g/ml}$ ; e C, AN e Cobre na concentração de 32  $\mu\text{g/ml}$ .

#### 4.4 Discussão

No presente estudo foi possível observar a transferência conjugativa de plasmídeo envolvido na resistência ao cobre para *Xac*. Vários trabalhos relatam a transferência de genes de resistência ao cobre entre bactérias fitopatogênicas (BENDER e COOKSEY, 1986; STALL et al., 1986; SUNDIN et al., 1989; BENDER, 1990; CAZORLA et al., 2002). Porém, este é o primeiro relato da obtenção de transconjugantes resistentes ao cobre por meio de conjugação entre isolados de *X. campestris* pv. *vesicatoria* e *Xac*.

Uma frequência relativamente baixa de transferência plasmidial foi observada após a conjugação em meio líquido, sólido e *in planta*. No entanto, a frequência foi suficiente para obter evidências de transferência horizontal de genes de resistência ao cobre entre isolados de *X. campestris* pv. *vesicatoria* e *Xac*. A variação na frequência com que se obteve transconjugantes resistentes ao cobre entre *X. campestris* pv. *vesicatoria* e *Xac* (0 a  $1,8 \times 10^{-5}$ ) foi semelhante à obtida entre isolados de *X. campestris* pv. *vesicatoria* utilizando o mesmo isolado doador, 81-23 (STALL et al., 1986).

Mutantes resistentes ao cobre do isolado receptor de *Xac* poderiam explicar o desenvolvimento de transconjugantes que se desenvolveram em meio de cultura contendo cobre e rifampicina. Entretanto, em testes repetidos, colônias do isolado receptor não se desenvolveram no meio em que os transconjugantes foram capazes de se desenvolver. Além disso, nenhum mutante do receptor desenvolveu em meio de cultura contendo cobre e rifampicina, quando  $10^7$  células foram plaqueadas no meio de cultura.

No presente estudo, transconjugantes foram capazes de se desenvolver em meio de cultura contendo concentrações superiores à concentração suportada pelo doador (32 µg/ml de cobre). BENDER e COOKSEY (1986), observaram o mesmo comportamento em transconjugantes obtidos entre *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Entretanto, não está clara a razão pela qual isso ocorre. A maior resistência ao cobre conferida aos transconjugantes obtidos neste trabalho deve ser investigada.

A homologia determinada por hibridizações e similaridade de seqüências nucleotídicas de genes de resistência ao cobre têm sido detectadas entre patovares do gênero *Xanthomonas* e *Pseudomonas*, sugerindo que tenha ocorrido troca horizontal de DNA plasmidial entre esses gêneros ou até mesmo com

outros gêneros (VOLOUDAKIS et al., 1993; LEE et al., 1994). Durante o sequenciamento do genoma de *Xac* foram identificados genes de resistência ao cobre localizados no cromossomo (da SILVA, 2002). Esses genes apresentaram alta identidade com o genes *copA* e *copB* de *P. syringae* pv. *tomato* (MELLANO e COOKSEY, 1988) e também ao *copA* e *copB* de *X. campestris* pv. *juglandis*, cuja resistência também está localizada em genes presentes no cromossomo (LEE et al., 1994).

Por décadas compostos cúpridos tem sido utilizados no controle de doenças fúngicas e bacterianas. O uso contínuo de agentes antimicrobianos à base de cobre pode ter favorecido a disseminação de genes de resistência ao cobre entre bactérias saprofíticas e fitopatogênicas (COOKSEY et al., 1990; ANDERSEN et al., 1991; ROGERS et al., 1994). Resistência ao cobre foi relatada pela primeira vez em isolados de *X. campestris* pv. *vesicatoria* provenientes de lavouras de pimentão e tomate na Flórida, Estados Unidos (MARCO e STALL, 1983). A resistência ao cobre em *X. campestris* pv. *vesicatoria* foi determinada por genes localizados em um plasmídeo autotransmissível de aproximadamente 200 kb, denominado pXvCu (STALL et al., 1986; BENDER et al., 1990). A mobilização desse plasmídeo por conjugação para outros isolados da mesma espécie foi verificada por STALL et al. (1986). Apesar da baixa frequência de transconjugantes obtidos neste trabalho, o método de transferência conjugativa *in planta* despertou uma grande preocupação quanto à possibilidade desse fenômeno ocorrer na natureza para *Xac*. Até o momento, no Brasil, não há evidências de resistência ao cobre nas populações de *X. axonopodis* pv. *citri* (MACIEL et al., 1988; MENEGUIM et al., em publicação). No entanto, resistência a cúpricos já foi reportada para isolados de *X. campestris* pv. *vesicatoria* no Brasil (AGUIAR et al., 2000). Na Argentina, existe apenas um relato de resistência ao cobre em *Xac*, em viveiros que receberam pulverizações frequentes de cobre (CANTEROS, 1996).

A transferência do plasmídeo que confere resistência ao cobre entre isolados de *X. campestris* pv. *vesicatoria* e *Xac* observada nesse trabalho é de grande importância e necessita de mais estudos. A presença de isolados resistentes pode favorecer à disseminação de genes de resistência ao cobre entre *X. campestris* pv. *vesicatoria* e populações de *Xac*.

## 5 CONCLUSÕES GERAIS

- Não há evidências de resistência ao cobre em isolados de *Xac* que ocorrem no Brasil e demais países da América do Sul, uma vez que todos os isolados analisados são sensíveis a concentrações iguais ou superiores a 16 µg/ml de cobre;
- Plasmídeo que confere resistência ao cobre é transferível por conjugação de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* para *X. axonopodis* pv. *citri*, tanto *in vitro* como *in planta*.

## REFERÊNCIAS

- ABECITRUS. **Exportações de FCOJ - Safra Atual**. Disponível em: <[http://www.abecitrus.com.br/exporta\\_br.html](http://www.abecitrus.com.br/exporta_br.html)> Acesso em: 08 abr. 2007
- ADASKAVEG, J. E.; HINE, R. B. Copper tolerance and zinc sensitivity of Mexican strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. **Plant Disease**, 69:993-996. 1985.
- AGUIAR, L. A.; KIMURA, O.; CASTILHO, A. M.; CASTILHO, K. S. C.; RIBEIRO, R. L. D.; AKIBA, F.; CARMO, M. G. F. Resistência ao cobre em isolados nacionais de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* de pimentão e tomateiro. **Agronomia**, 34:78-82. 2000.
- ALVA, A. K.; GRAHAM, J. H.; ANDERSON, C. A. Soil pH and copper effects on Young "Hamlin" orange trees. **Soil Science Society of America Journal**, 59:481-487. 1995.
- AMARAL, S.F. Providências para a erradicação do cancro cítrico. **O Biológico**, 23:112-123, 1957.
- ANDERSEN, G. L.; MENKISSOGLU, O.; LINDOW, S.E. Occurrence and properties of copper-tolerant strains of *Pseudomonas syringae* isolated from fruit trees in California. **Phytopathology**, 81:648-656. 1991
- ASSOCITRUS. **Informativo Associtrus**. Disponível em: <[http://www.associtrus.com.br/arquivos/INFORMATIVO\\_01\\_JAN.pdf](http://www.associtrus.com.br/arquivos/INFORMATIVO_01_JAN.pdf)>. Acesso em: 08 abr. 2007.
- AZEVEDO, J. L. Herança Extracromossômica nos Microrganismos. In: **Genética de Microrganismos**. 1 ed. Goiânia: Editora Universidade de Goiás, v. 1. 1998. 478 p.
- BARBOSA, J. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; MASSARI, C. A.; AYRES, A. J. Incidência e distribuição de cancro cítrico em pomares comerciais do Estado de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologica**, 27:30-35. 2001.
- BASIM, H.; STALL, R. E.; MINSAVAGE, G. V.; JONES, J. B. Chromosomal gene transfer by conjugation in the plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology**, 89:1044-1049. 1999.

- BENDER, C. L.; MALVICK, D. K.; CONWAY, K. E.; GEORGE, S.; PRATT, P. Characterization of pXV10A, a copper resistance plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Applied and Environmental Microbiology**, 56:170-175. 1990.
- BENDER, C. L.; COOKSEY, D. A. Molecular cloning of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **Journal of Bacteriology**, 169:470-474. 1987.
- BENDER C. L.; COOKSEY, D. A. Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: conjugative transfer and role in copper resistance. **Journal of Bacteriology**, 165:534-541. 1986.
- BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. Importância das doenças de plantas. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H; AMORIN, L. eds. **Manual de Fitopatologia**. Volume 1: Princípios e conceitos, 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 13-33. 1995.
- BITANCOURT, A. A. O cancro cítrico. **O Biológico**, 23:101-111. 1957.
- BRAITHWAITE, M.; LEITE, R. P.; SMITH, J. J.; BOA, E.; SADDLER, G. S. First report of citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* on *Citrus sinensis* in Bolivia. **Plant Pathology**, 51:383. 2002.
- BROWN, J. R. Ancient horizontal gene transfer. **Nature Reviews Genetics**, 4:121-132. 2003.
- BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, 4:141-157. 2003.
- BURR, T. J.; NORELLI, J. L; KATZ, B.; WILCOX, W. F.; HOYING, S. A. Streptomycin resistance of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* in apple orchards and its association with a conjugative plasmid. **Phytopathology**, 78:410-413. 1988.
- CANTEROS, B. I. Citrus canker in Argentina – control, eradication, and current management. In: INTERNACIONAL CITRUS CANKER RESEARCH WORKSHOP, 2000, Fort Pierce. **Proceedings...** Fort Pierce: Florida Department of Agriculture and Consumer Services, 2000. Disponível em: <<http://www.doacs.state.fl.us/canker>>. Acesso em: 25 out. 2006.

CANTEROS, B. I. Copper resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. **Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Conference of Plant Pathogenic Bacteria**. Madras, Índia, 455-459. 1996.

CANTEROS, B. I.; ZAGORY, D.; STALL, R. E. A medium for cultivation of the B-strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, cause of cancrrosis B in Argentina and Uruguay. **Plant Disease**, 65:122-123. 1985

CAZORLA, F. M.; ARREBOLA, E., SESMA, A., PÉREZ-GARCÍA, A., CODINA, J. C., MURILLO, J.; DE VICENTE, A. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* strains isolated from mango is encoded mainly by plasmids. **Phytopathology**, 92:909-916. 2002.

CHA, J. S.; COOKSEY, D. A. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 88:8915-8919. 1991.

CIVEROLO, E.L. Bacterial canker disease of citrus. **Journal of the Rio Grande Valley Horticultural Society**, 37:127-146. 1984.

CNA. **Exportações do agronegócio têm saldo recorde de US\$ 9,7 bilhões no trimestre**. Disponível em: <[http://www.cna.org.br/cna/publicacao/down\\_anexo.wsp?tmp.arquivo=E22\\_16428ba lançajan-mar%2007.pdf](http://www.cna.org.br/cna/publicacao/down_anexo.wsp?tmp.arquivo=E22_16428ba lançajan-mar%2007.pdf)>. Acesso em: 08 abr2007.

COOKSEY, D. A. Copper uptake and resistance in bacteria. **Molecular Microbiology**, 7: 1-5. 1993.

COOKSEY, D. A. Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, 28:201-219. 1990.

COOKSEY, D. A.; AZAD, H. R.; CHA, J.; LIM, C. Copper resistance gene homologs in pathogenic and saprophytic bacterial species from tomato. **Applied and Environmental Microbiology**, 56:431-435. 1990.

COOKSEY D. A.; GRAHAM, J. H. Genomic fingerprinting of two pathovars of phytopathogenic bacteria by rare-cutting restriction enzymes and field inversion electrophoresis. **Phytopathology**, 79:745-750. 1989.

COOKSEY, D. A. Characterization of a copper resistance plasmid conserved in copper-resistance strains of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **Applied and Environmental Microbiology**, 53:454-456. 1987

COPLIN, D. L. Plasmids and their role in the evolution of plant pathogenic bacteria. **Annual Review Phytopathology**, 27:187-212. 1989.

COPLIN, D. L.; ROWAN, R. G.; CHISHOLM, D. A.; WHITMOYER, R. E. Characterization of plasmids in *Erwinia stewartii*. **Applied and Environmental Microbiology**, 42:599-604. 1981.

CURTIS III, R. Gene Transfer. In: GERHARDT, P.; MURRAY, R. G. E.; COSTILOW, R. N.; NESTER, E. W.; WOOD, W. A.; KRIEG, N. R.; PHILLIPS, G. B. eds. **Manual of Methods for General Bacteriology**. American Society for Microbiology, p. 243-265. 1981.

da SILVA, A. C.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VAN SLUYS, M. A.; ALMEIDA, N. F.; ALVES, L. M.; do AMARAL, A. M.; BERTOLINI, M. C.; CAMARGO, L. E.; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOZO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L. P.; CICARELLI, R. M.; COUTINHO, L. L.; CURSINO-SANTOS, J. R.; EL-DORRY, H.; FARIA, J. B.; FERREIRA, A. J.; FERREIRA, R. C.; FERRO, M. I.; FORMIGHIERI, E. F.; FRANCO, M. C.; GREGGIO, C. C.; GRUBER, A.; KATSUYAMA, A. M.; KISHI, L. T.; LEITE, R. P.; LEMOS, E. G.; LEMOS, M. V.; LOCALI, E. C.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A. M.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; MARTINS, E. C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C. F.; MIYAKI, C. Y.; MOON, D. H.; MOREIRA, L. M.; NOVO, M. T.; OKURA, V. K.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, V. R.; PEREIRA, H. A.; ROSSI, A.; SENA, J. A.; SILVA, C.; de SOUZA, R. F.; SPINOLA, L. A.; TAKITA, M. A.; TAMURA, R. E.; TEIXEIRA, E. C.; TEZZA, R. I.; TRINDADE DOS SANTOS, M.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; WHITE, F. F.; SETUBAL, J. C.; KITAJIMA, J. P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, 417:459-463. 2002.

DAVISON, J. Genetic exchange between bacteria in the environment. **Plasmid**, 42:73-91 1999.

DOOLITTLE, W. F. Phylogenetic classification and the universal tree. **Science**, 284:2124-2129. 1999

EGEL, D. S.; GRAHAM, J. H.; STALL, R. E. Genomic relatedness of *Xanthomonas campestris* strains causing disease of citrus. **Applied and Environmental Microbiology**, 57:2724-2730. 1991.

FAWCETT, H. S.; BITANCOURT, A. A. Observaciones sobre las enfermedades de los citrus en la Republica Argentina. **Revista Sudamericana de Botanica**, 8:29-45. 1949.

FEICHTENBERGER, E. Manejo ecológico das principais doenças fúngicas e bacterianas dos citros no Brasil. In: Donadio, L. C. e Rodriguez, O. eds. **Anais do Quinto Seminário Internacional de citros – Tratos culturais**. Bebedouro: Fundação Cargil, p. 23-65. 1998.

FEICHTENBERGER, E.; MÜLLER, G. W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros (*Citrus* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres 2:261-296. 1997.

FUNDECITRUS. **Cancro cítrico**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro.html>> Acesso em: 05 nov. 2005.

GABRIEL, D. W.; KINGSLEY, M. T.; HUNTER, J. E.; GOTTWALD, T. R. Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) to species and reclassification of all *Xanthomonas campestris* pv. *citri* strains. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 39:14-22. 1989.

GARCIA-HORSMAN, J. A.; BARQUERA, B.; RUMBLEY, R.; MA, J.; GENNIS, R. B. The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. **Journal Bacteriology**, 146:5587-5600. 1994.

GARDE, S.; BENDER, C. L. DNA probes for detection of copper resistance genes in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Applied and Environmental Microbiology**, 57:2435-2439. 1991.

GOTO, M.; HYODO, H. Role of extracellular polysaccharides of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the early stage of infection. **Annual Phytopathology Society of Japan**, 51:22-31. 1985.

GOTTWALD, T. R.; IREY, M. Post-hurricane analysis of citrus canker II: Predictive model estimation of disease spread and area potentially impacted by various eradication protocols following catastrophic weather events. Online. **Plant Health Progress** doi:10.1094/PHP-2007-0405-01-RS. 2007. Disponível em: <http://www.apsnet.org/online/feature/hurricane/>>. Acesso em: 13 mai. 2007.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. Citrus canker: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress**, St. Paul. DOI:10.1094/PHP-2002-0812-01-RV.2002. Disponível em: <<http://www.plantmanagementwork.org/php>>. Acesso em: 15 jul. 2005.

GOTTWALD, T. R.; HUGHES, G.; GRAHAM, J. H.; XIAOAN, S.; RILEY, T. The citrus canker epidemic in Florida: The scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species. **Phytopathology**, 91:30-34. 2001.

GOTTWALD, T. R.; TIMMER, L. W. The efficacy of windbreaks in reducing the spread of citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. **Tropical Agriculture**, 72:194-201. 1995.

GOTTWALD, T. R.; McGUIRE, R. G.; GARRAM, S. Asiatic citrus canker: spatial and temporal spread in simulated new planting situations in Argentina. **Phytopathology**, 78:739-745. 1988.

GRAHAM, J. H. Varietal susceptibility to citrus canker: Observations from southern Brazil. **Citrus Industry**, 82:15-17. 2001.

GRIFFITH, F. The significance of pneumococcal types. **Journal of Hygiene**, 27:113-159. 1928

HENDRICK, C. A.; HASKINS, W. P.; VIDAVER, A. K. Conjugative plasmid in *Corynebacterium flaccumfaciens* subsp. *oortii* that confers resistance to arsenite, arsenate, and Antimony(III). **Applied and Environmental Microbiology**, 48:56-60. 1984.

HOSHINO, N.; KIMURA, T.; YAMAJI, A.; ANDO, T. Damage to the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by catechin-copper complexes. **Free Radical Biology & Medicine**, 27:1245-1250. 1999

KOIZUMI, M. Citrus canker: The word situation. In: TIMMER, L.W. (Ed.). Citrus canker: An international perspective. **University of Florida/Institute of Food and Agricultural Science**, 1985. pp. 340-344.

KADO, C. I.; LIU, S. T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. **Journal of Bacteriology**, 145:1365-1373. 1981.

KUHARA, S. Present epidemic status and control of the citrus canker disease (*Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson) in Japan. **Review of Plant Protection Research**, 11:132-142. 1978.

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

LEITE JÚNIOR, R. P. Surviving with Citrus Canker in Brazil. **Proceedings of the International Society fo Citriculture**. 9<sup>o</sup> Congress. Orlando, Florida 2000. pp 890-896.

LEITE JÚNIOR, R. P. Cancro cítrico: prevenção e controle no Paraná. IAPAR. **Circular** 61. 51p. 1990.

LEITE JÚNIOR, R. P.; MOHAN, S. K. Integrated management of the citrus bacterial canker disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the State of Paraná, Brazil. **Crop Protection**, 9:3-7. 1990.

LEITE JÚNIOR, R. P.; MOHAN, 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**, 12:257-263. 1987.

LIM, C.-K.; COOKSEY, D. A. Characterization of chromosomal homologs of the plasmid-borne copper resistance operon of *Pseudomonas syringae*. **Journal Bacteriology**, 175:4492-4498. 1983.

MACIEL, J. L. N.; DUARTE, V.; AYUB, M. A. Z. Plasmid DNA restriction profile and copper sensitivity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Rio Grande do Sul, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, 23:116-120. 1998.

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

MARINGONI, A. C.; KUROZAWA, C.; BARBOSA, V.; SILVA NETO, J. C. Controle químico da mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye) do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Summa Phytopathologica**, 12:92-101. 1986.

MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; FIGUEIREDO, J. O.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros: principais informações e recomendações de cultivo**. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/Citros/Citros.htm>> Acesso em: 28 nov. 2006.

McGUIRE, R. G. Evaluation of bactericidal chemicals for control of *Xanthomonas* on citrus. **Plant Disease**, 72:1016-1020. 1988.

MEDINA-URRUTIA, V. M.; STAPLETON, J. J. Control of Mexican lime bacteriosis with copper-based products. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, 98:22-25. 1985.

MELLANO, M. A.; COOKSEY, D. A., Nucleotide sequence and organization of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **Journal of Bacteriology**, 170:2879-2883. 1988.

MENEGUIM, L.; RINALDI, D. A. M. F.; SANTOS, A. A. S.; RODRIGUES, L. S. SILVA, M. R. L.; CANTERI, M. G.; LEITE JÚNIOR, R. P. Sensibilidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ao cobre e mancozeb. **Fitopatologia Brasileira** (em publicação)

MILLER, J. H. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, N.Y: **Cold Spring Harbor Laboratory**, 1972. p. 433.

MINSAVAGE, G. V.; DAHLBECK, D.; WHALEN, M. C.; KEARNEY, B.; BONAS, U.; STASKAWICZ, B. J.; STALL, R. E. Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*-pepper interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 3:41-47. 1990.

MULLER, J.; SIGEL, R. K. O.; LIPPERT, B. Heavy metal mutagenesis: insights from bioinorganic model chemistry. **Journal Inorganic Biochemical**, 79:261-265. 2000.

NAKAJIMA, M.; GOTO, M.; HIBI, T. Similarity between copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and *P. syringae* pv. *tomato*. **Journal of General Plant Pathology**, 68:68-74. 2002.

NASCIMENTO, J. F.; RODRIGUES NETO, J.; ALVES, J. M. A.; RÊGO, M. M.; ARAÚJO, A. E. S. Ocorrência de cancro cítrico no Estado de Roraima. **Summa Phytopathologica**, 29:81-82. 2003.

OCHMAN, H.; LAWRENCE, J. G.; GROISMAN, E. A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**, 405:299-304. 2000.

PANOFF, J. M.; CHUITON, C. Horizontal gene transfer: A universal phenomenon. **Hera**, 10:939-943. 2004.

PETIT, A.; TEMPE, J.; KERR, A.; HOLSTERS, M.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. Substrate induction of conjugative activity of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids. **Nature**, 271:570-572. 1978.

ROGERS, J. S.; CLARK, E.; CIRVILLERI, G.; LINDOW, S. E. Cloning and characterization of genes conferring copper resistance in epiphytic ice nucleation-active *Pseudomonas syringae* strains. **Phytopathology**, 84:891-897. 1994.

ROMEIRO, R. S. Bactérias fitopatogênicas. Viçosa: **Imprensa Universitária**. 1995.

ROSSETTI, V. Identificação de cancro cítrico. **Biológico**, 47:145-153, 1981.

ROSSETTI, V. **Manual ilustrado de doenças dos citros**. Piracicaba: Fealq/Fundecitrus. 2001. 207p.

SAMBROOK, J.; FRITSCH E. F.; MANIATIS T. Molecular cloning - a laboratory manual". 2nd Edition, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, U.S.A. 1989.

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

SCHAAD, N. W.; VIDAVER, A. K.; LACY, G. H.; RUDOLPH, K.; JONES, J. B. Evaluation of proposed amended names of several *Pseudomonads* and *Xanthomonads* and recommendations. **Phytopatology**, 90:208-213. 2000.

SCHAAD, N. W. Initial identification of common genera. In: SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W (Eds.) Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Saint Paul. **American Phytopathological Society Press**. 2001. pp. 1-15.

SCHECK, H. J.; PSCHIEDT, J. W. Effect of copper bactericides on copper-resistance and -sensitive strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **Plant Disease**, 82:397-406. 1998.

SCHOULTIES, C. L.; CIVEROLO, E. L.; MILLER, J. W.; STALL, R. E.; KRASS, C. J.; POE, S. R.; DUCHARME, E. P. Citrus canker in Florida. **Plant Disease** 71: 388-395. 1987.

SCHUBERT, T. S.; RIZVI, S. A.; SUN, X.; GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; DIXON, W. N. Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida-again. **Plant Disease**, 85:340-356. 2001.

SCHUBERT, T. S.; MILLER, J. W. Bacterial citrus canker. Gainesville, Florida, FDACS, **Division of plant industry**, 6 fold. 2000.

SILVER, S.; WALDERHAUG, M. Gene regulation of plasmid- and chromosome determined inorganic ion transport in bacteria. **Microbiological Reviews**, 56:195-228. 1992.

SØRENSEN, S. J.; BAILEY, M.; HANSEN, L.H.; KROER, N; WUERTZ, S. Studying plasmid horizontal transfer *in situ*: A critical review. **Nature**, 3:700-710. 2005.

STALL, R. E.; CIVEROLO, E. L.. Research relating to the recent outbreak of citrus canker in Florida. **Annual Review of Phytopathology**, 29:339-420. 1991.

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

STALL, R. E.; SEYMOR, C. P. Canker, a threat to citrus in the Gulf-Coast states. **Plant Disease**, 67:581-585. 1983.

STALL, R. E.; MILLER, J. W.; CANTEROS, B. I. E. Population dynamics of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* causing canker of citrus in Argentina. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, 93:10-14. 1980.

SUMMERS, A. O.; SILVER, S. Microbial transformations of metals. **Annual Review Microbiology**, 32: 637-672. 1978.

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

TREVORS, J.T. Evolution of gene transfer in bacteria. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 15:1-6, 1999.

TURNER, S. L.; BAILEY, M. J.; LILLEY, A. K.; THOMAS, C. M. Ecological and molecular maintenance strategies of mobile genetic elements. **FEMS Microbiology Ecology**, 42:177–185. 2002.

USDA. **Citrus Situation 2005/06**. Disponível em:  
<[http://www.fas.usda.gov/htp/Hort\\_Circular/2006/02-06/02-20-06%20Citrus%20Feature.pdf](http://www.fas.usda.gov/htp/Hort_Circular/2006/02-06/02-20-06%20Citrus%20Feature.pdf)> Acesso em 10 nov 2006.

van ELSAS, J. D.; BAILEY, M. J. The ecology of transfer of mobile genetic elements. **FEMS Microbiology Ecology**, 42:187–197. 2002.

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

VERNIÈRE, C. J.; GOTTWALD, T. R.; PRUVOST, O. Disease development and symptom expression of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in various citrus plant tissues. **Phytopathology**, 93:832-843. 2003.

VERNIÈRE, C.J; 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**, 104:477-487. 1998.

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

VOLOUDAKIS, A. E.; BENDER, C. L.; COOKSEY, D. A. Similarity between copper resistance gene from *Xanthomonas campestris* and *Pseudomonas syringae*. **Applied and Environmental Microbiology**, 59:1627-1634. 1993.

YANG, Y. N.; YUAN, Q. P.; GABRIEL, D. W. Watersoaking function(s) of XcmH1005 are redundantly encoded by members of the *Xanthomonas avr/pth 6* gene family. **Mol. Plant-Microbe Interact**, 9:105-113. 1996.