



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL  
DE PERNAMBUCO**  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM FITOPATOLOGIA**

**Tese de Doutorado**

**CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA E DESCRIÇÃO DE  
NOVAS HOSPEDEIRAS DE ISOLADOS DE *Xanthomonas*  
*citri* subsp. *citri* DO NORDESTE DO BRASIL**

**Lucas Correia Santana Amancio**

**Recife – PE  
2022**

**LUCAS CORREIA SANTANA AMANCIO**

**CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA E DESCRIÇÃO DE  
NOVAS HOSPEDEIRAS DE ISOLADOS DE *Xanthomonas citri*  
subsp. *citri* DO NORDESTE DO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fitopatologia.

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elineide Barbosa de Souza (UFRPE) – Orientadora

Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama (UFRPE) – Co-orientador

Prof. Dr. Rui Sales Junior (UFERSA) – Co-orientador

**RECIFE – PE  
JULHO – 2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- A484c Amancio, Lucas Correia Santana  
CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA E DESCRIÇÃO DE NOVAS HOSPEDEIRAS DE ISOLADOS DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri* DO NORDESTE DO BRASIL / Lucas Correia Santana Amancio. - 2022.  
95 f. : il.
- Orientadora: Elineide Barbosa de Souza.  
Coorientador: Marco Aurelio Siqueira da Gama.  
Inclui referências e apêndice(s).
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, 2022.
1. Citrus sp.. 2. Cancro cítrico. 3. rep-PCR. 4. Cobre. 5. Gama de hospedeiro. I. Souza, Elineide Barbosa de, orient. II. Gama, Marco Aurelio Siqueira da, coorient. III. Título

**CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA E DESCRIÇÃO DE  
NOVAS HOSPEDEIRAS DE ISOLADOS DE *Xanthomonas citri*  
subsp. *citri* DO NORDESTE DO BRASIL**

**LUCAS CORREIA SANTANA AMANCIO**

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 22/07/2022

**ORIENTADOR:**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elineide Barbosa de Souza (UFRPE)

**EXAMINADORES:**

---

Prof. Dr. José Belasque Júnior (ESALQ)

---

Prof. Dr. Rui Sales Júnior (UFERSA)

---

Dr. Adriano Marcio Freire Silva (UFRPE)

---

Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara (UFRPE)

**RECIFE – PE  
JULHO – 2022**

*Meus pais Geraldo Amancio e Cleide Correia*

*Minha irmã Maryana Correia*

*Minha madrinha Vera Correia*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, inicialmente, pelo dom da vida, por minha saúde e por ter colocado ótimas pessoas em minha vida.

Aos meus pais Geraldo Santana Amancio e Cleide Correia Santana, pelo incentivo, pelo amor, pelos ensinamentos, pelas palavras de apoio e motivação e por nunca terem desistido de mim.

Agradeço a minha madrinha Francisca Vera Correia e irmã Maryana Correia, pelos momentos e palavras de incentivo.

Agradeço a minha namorada Michele Nascimento, pelo amor e apoio em todos os momentos durante essa caminhada.

À Universidade Federal Rural do Pernambuco (UFRPE) e ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia (PPGF), por todo o suporte e estrutura necessária para realização de um sonho.

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elineide Barbosa de Souza, pelo esforço que constantemente teve para com seus alunos e integrantes da equipe do Laboratório de Fitobacteriologia (LAFIBAC) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pela amizade, pela contribuição em me fazer uma pessoa melhor, pelos ensinamentos.

Aos meus co-orientadores, Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama e Prof. Dr. Rui Sales Junior pela grande ajuda e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho. Ao Prof. Dr. Adriano Silva e Prof. Dr. Maruzanete Pereira de Melo, pelo apoio e todo conhecimento compartilhado.

Aos meus amigos, antigos e novos integrantes do LAFIBAC, por todos os momentos compartilhados. Especialmente Emanuel Assunção, Igor Pimentel, Lucas Lucena, Keyla Lopes, Messias, David Ferreira, Wallison Oliveira, Claudeana Souza, Greecy Albuquerque, Géssyka Rodrigues, Leandro Shibutani, Ana Dulce, Beatriz Cruz, Ana Karolina, Pedro Henrique, Roberto Farias, Rodrigo Pimentel, Leandro Vélez, Leandro Victor, Marcelle Andressa, Taciana, Fabiola Vital, Fernanda Del Corona, Fernanda Larisse, Marcelo Gonçalves, Victória Liberal, Sthefany e Lucas Nascimento.

A todos os meus amigos da Fitopatologia UFRPE e colegas de turma, especialmente Mariana David, Mari Lunardi, Kledson Mendes, Grazielle Lima, Fábio Junior, Jadson Araujo, Ailton

Cruz, Felipe Araújo, Gabriele Gurguel, Risoneide de Cássia, Rezanio Carvalho, e todos os demais alunos do Mestrado e Doutorado em Fitopatologia da UFRPE pelos momentos compartilhados.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da UFRPE pelos ensinamentos transmitidos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Finalmente, a todos que de uma forma ou de outra fizeram parte desta conquista.

## SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS .....	vi
RESUMO GERAL .....	viii
GENERAL ABSTRACT .....	ix
CAPÍTULO I – Introdução Geral .....	11
1. A citricultura.....	11
2. Cancro cítrico.....	14
3. <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> .....	17
4. Resistência de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> a cúpricos.....	19
5. Diversidade genética de <i>Xanthomonas</i> spp. causadoras de cancro em citros.....	21
6. Técnicas empregadas para caracterização polifásica de <i>Xanthomonas</i> spp.....	23
Referências Bibliográficas.....	27
CAPÍTULO II – First Report of <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> Causing Citrus Canker on Lime in Rio Grande do Norte, Brazil.....	37
References.....	39
CAPÍTULO III – Polyphasic characterization of <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> strains associated with citrus canker in Northeast Brazil.....	41
Abstract .....	42
Introduction .....	43
Materials and methods .....	44
Results .....	48
Discussion.....	50
References.....	52
CAPÍTULO IV – Sensitivity of <i>Xanthomonas citri</i> subsp <i>citri</i> strains from Northeast Brazil to copper-based bactericides and description of plants of the Anacardiaceae family as putative hosts.....	77
References.....	84
CONCLUSÕES GERAIS.....	94



## RESUMO GERAL

O cancro cítrico é uma das principais ameaças a cultura dos citros no Brasil. Essa doença tem como agente causal a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, classificada como praga quarentenária. No Nordeste, essa bactéria é pouco estudada, aumentando a preocupação devido ao seu potencial destrutivo. Assim, os objetivos desse trabalho foram: (i) montar uma coleção de isolados de *X. citri* subsp. *citri* do Nordeste brasileiro; (ii) investigar e relatar existência do cancro cítrico no estado do Rio Grande do Norte; (iii) caracterizar a variabilidade genética de isolados de *X. citri* subsp. *citri* obtido do Nordeste brasileiro por meio de genotipagem rep-PCR; (iv) realizar a identificação molecular desses isolados por meio de análise da sequência multilocos (MLSA); (v) caracterizar os isolados utilizando testes bioquímicos por meio do sistema Biolog®; (vi) realizar a caracterização patológica utilizando diferentes cultivares de citros; (vii) determinar a sensibilidade a cúpricos de isolados de *X. citri* subsp. *citri*, investigando os genes envolvidos na resistência; (viii) testar a capacidade de plantas não pertencentes a família Rutacea servirem como hospedeiras de *X. citri* subsp. *citri*. Um total de 143 isolados foram obtidos de diferentes áreas e Estados do Nordeste brasileiro. Por meio de análises de MLSA, foi realizado o primeiro registro do cancro cítrico no estado no Rio Grande do Norte. A utilização conjunta de rep-PCR (REP, ERIC, e BOX), MLSA e Biolog confirmam que a população de isolados obtidos apresentam baixa variabilidade genética e bioquímica, sugerindo a presença de uma população geneticamente homogênea no Nordeste do Brasil. Além disso, confirmamos a ocorrência do cancro cítrico nos estados do Ceará e Piauí. Teste de patogenicidade em cultivares diferenciadoras indicam que todos os isolados em nossa coleção pertencem ao patotipo A e, aparentemente, não há subtipos de *X. citri* subsp. *citri*. Isolados representativos submetidos a teste de sensibilidade *in vitro* apresentam comportamento similar quanto a sensibilidade a hidróxido de cobre e oxiclreto de cobre. Além disso, os genes *CopA* e *CopB* não estão presentes nesses isolados, o que indica aparentemente a inexistência de isolados resistentes a cobre. Entretanto, o gene *copL* foi detectado em todos os isolados testados, porém ao que parece, não confere sozinho resistência a cobre. Por fim, foi realizado o primeiro registro da infecção em *Anacardium occidentale*, *Schinus terebinthifolia* e *Mangifera indica* por *X. citri* subsp. *citri*, através de inoculação artificial, sugerindo que estas plantas podem servir como hospedeiras alternativas para *X. citri* subsp. *citri*.

**Palavras-chave:** *Citrus* sp., cancro cítrico, MLSA, Rep-PCR, variabilidade genética, Biolog, cobre, gama de hospedeiro.

## GENERAL ABSTRACT

Citrus canker is one of the main threats to citrus culture in Brazil. This disease is caused by the bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, classified as a quarantine organism. In the Northeast this bacterium is little studied, increasing the concern due to its destructive potential. Therefore, this study aimed: (i) to assemble a collection of *X. citri* subsp. *citri* strains from Northeast Brazil; (ii) to investigate and report the existence of citrus canker in the state of Rio Grande do Norte; (iii) to characterize the genetic variability of *X. citri* subsp. *citri* strains obtained from Northeast Brazil through rep-PCR genotyping; (iv) to perform the molecular identification of these strains through multilocus sequence analysis (MLSA); (v) to characterize the strains using biochemical tests, using the Biolog® system; (vi) to carry out the pathological characterization using different citrus cultivars; (vii) to characterize the sensitivity of isolates of *X. citri* subsp. *citri* to copper-based bactericides and investigating the genes involved in resistance; (viii) to test the ability of plants not belonging to the Rutaceae family to serve as hosts for *X. citri* subsp. *citri*. A total of 143 strains were obtained from different areas and states of the Brazilian Northeast. Through MLSA analyses, was carried the first report of citrus canker in the state of Rio Grande do Norte. The combination of rep-PCR (REP, ERIC, and BOX), MLSA and Biolog confirms that the population of strains obtained has low genetic and biochemical variability, suggesting a genetic homogeneity among the strains present in the Northeast region. In addition, we confirmed the occurrence of citrus canker in the states of Ceará and Piauí. The Pathological characterization on different citrus cultivars indicate that all strains in our collection belong to pathotype A and, apparently, there are no subtypes of *X. citri* subsp. *citri*. Representative strains used in the *in vitro* sensitivity test show similar results in terms of sensitivity to copper hydroxide and copper oxychloride. Furthermore, *CopA* and *CopB* genes are not present in these strains, which apparently indicates the absence of copper-resistant strains. However, the *copL* gene was detected in all tested strains, but alone it does not confer copper resistance. Finally, was performed the first report of infection in *Anacardium occidentale*, *Schinus terebinthifolia* and *Mangifera indica* by *X. citri* subsp. *citri*, through artificial inoculation, suggesting that these plants can serve as alternative hosts for *X. citri* subsp. *citri*.

**Keywords:** *Citrus* sp., citrus canker, MLSA, Rep-PCR, genetic variability, Biolog, copper, host range

# Capítulo I

---

---

## Introdução Geral

# CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA E DESCRIÇÃO DE NOVAS HOSPEDEIRAS DE ISOLADOS DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri* DO NORDESTE DO BRASIL

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1. A citricultura

No cenário brasileiro, a citricultura representa uma das principais atividades econômicas, contribuindo na geração de empregos e influenciando diretamente na economia do país (NEVES; TROMBIN, 2017). O cultivo de citros teve início com a chegada dos colonizadores portugueses no século XVI, com a introdução de sementes de laranja doce (*Citrus sinensis* L.) nos estados da Bahia e São Paulo. Entretanto, tornou-se uma atividade comercial somente no século XX (ALMEIDA; PASSOS, 2011). No Nordeste, a citricultura não se destaca na produção nacional, mas tem grande importância social e econômica, principalmente nos estados da Bahia, Sergipe e Alagoas, principais polos produtores (VIDAL, 2018; PANTA *et al.*, 2019).

Com aproximadamente 608.697 ha cultivados e 19.319.750 toneladas produzida em 2020, somando os cultivos de laranjas, limões e tangerinas (IBGE, 2022), a citricultura é uma das atividades mais importante economicamente para o país (NEVES; TROMBIN, 2017). A região Sudeste destaca-se como principal região produtora, com 472.115 ha cultivados e 15.940.909 toneladas produzida, seguida pelas regiões Nordeste e Sul, com 108.560 e 68.418 ha cultivados e 1.287.269 e 1.256.945 toneladas produzidas, respectivamente. Desse total, a região Nordeste é responsável por aproximadamente 6% da produção do país (IBGE, 2022), sendo grande parte da produção destinada ao consumo *in natura* (MIRANDA *et al.*, 2011), enquanto na região Sudeste é para indústria, especificamente para produção de suco de laranja concentrado congelado para exportação (BASTOS *et al.*, 2014; NEVES; TROMBIN, 2017).

De acordo com o Departamento da Agricultura dos Estados Unidos (USDA) a laranja é a principal fruta cítrica cultivada em todo mundo. Ainda segundo esse mesmo órgão, o Brasil é responsável por mais da metade do suco produzido no mundo considerando a média das últimas safras (USDA, 2022), enquanto as exportações brasileiras do fruto *in natura* são pouco significativas quando comparadas aos envios do suco de laranja ao exterior (VIDAL *et al.*, 2018). No que diz respeito aos demais citros para os quais se tem informações, a participação brasileira na produção é insignificante. A china responde por boa parte da

produção mundial de tangerina, enquanto o México, Argentina e a União Europeia são os maiores produtores mundiais de limões e lima (*Citrus aurantifolia* Christm) (VIDAL *et al.*, 2018).

A espécie *C. sinensis* é economicamente a mais importante para citricultura brasileira. A principal laranja doce cultivada no país é a cultivar Pêra, seguida das cultivares Natal, Valência e folha murcha, destinadas principalmente ao processamento de suco. A espécie *Citrus reticulata* L. compõe o segundo grupo de frutas cítricas mais produzidas no Brasil, com predominância das cultivares ‘Ponkan’ e a ‘Murcott’, seguida pelo grupo das limeiras e limoeiros, com destaque as cultivares ‘Lima-da-pérsia’ (*Citrus limettioides* Tan.), ‘Tahiti’ (*Citrus latifolia* Tan.), e ‘galego’ (*C. aurantifolia*). No país cerca de 80% dos pomares utilizam como porta-enxerto o limoeiro ‘Cravo’ (*Citrus limonia* Osbeck) em função de suas características, como vigor, tolerância ao estresse hídrico, fácil obtenção de sementes, grande vigor no viveiro, bom pegamento de mudas no plantio, rápido crescimento e produção alta e precoce. Porém outros porta-enxertos também são utilizados, como ‘Cleópatra’ (*Citrus reshni* hort. ex Tanaka), ‘Citrumelo Swingle’ (*Citrus paradisi* L. x *Poncirus trifoliata* L.), ‘Sunki’ (*Citrus sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka), ‘Trifoliata’ (*P. trifoliata*), ‘Trifoliata Flying Dragon’ (*P. trifoliata*), ‘Volkameriano’ (*Citrus volkameriana* Pasq.) e ‘Rugoso’ (*Citrus jambhiri* Lush) (BASTOS *et al.*, 2014 ).

No que diz respeito a citricultura no Nordeste brasileiro, sabe-se que essa região possui características específicas devido as condições climáticas e posição geográfica privilegiada capaz de tornar essa região a principal área de expansão dos citros. A região possui condições ecológicas adequadas, disponibilidade de área, logística, proximidade das regiões produtoras às capitais e grandes cidades e ausência de doenças altamente prejudiciais à citricultura (PASSOS *et al.*, 2011).

No Nordeste, os estados da Bahia, Sergipe e Alagoas, são os principais produtores de citrus, juntos cobrindo uma área de 101.275 ha e 1.217.143 toneladas produzidas, respondendo por aproximadamente 95% da produção na região, somando os cultivos de laranja, limão e tangerina. Desse total, o estado da Bahia é responsável por aproximadamente 53% da produção nordestina, onde a produção concentra-se no município de Rio Real, localizado no Litoral Norte da Bahia (IBGE, 2022). Em Sergipe, grande parte dos pomares estão localizados no sul do Estado, na região dos tabuleiros Costeiros, em aproximadamente 11.000 estabelecimentos (PANTA *et al.*, 2019). Em Alagoas o principal polo produtor é o vale do Mandaú, onde se destaca o município de Santana do Mandaú (FERREIRA *et al.*, 2013). Os demais estados também participam da produção, porém em menor escala (IBGE,

2022). O destino dessa produção em grande parte é para o abastecimento do mercado interno (SHIBATA *et al.*, 2014).

Atualmente grande parte dos pomares presentes na Bahia e Sergipe utilizam laranja pêra (*C. sinensis*) como cultivar copa enxertada em porta-enxerto de limoeiro rugoso (*C. jambhiri*) ou cravo (*C. limonia*). É uma maneira de unir características de sabor e aceitabilidade da laranja pêra com a rusticidade e adaptabilidade dos limoeiros rugosos ou cravo, pouco comerciais (BASTOS *et al.*, 2014). No estado alagoano a citricultura tem como diferencial o cultivo de laranja lima (*C. ourantifolia*), particularidade que vem destacando o estado como o principal produtor desta variedade no Nordeste e no Brasil (ALMEIDA *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2013).

A cadeia produtiva da citricultura aumenta a importância social da atividade. Somente de Janeiro a setembro de 2017, o setor criou 45.009 novos postos de trabalho no país no cultivo de laranja, 15% a mais do que o mesmo período de 2016 (NEVES; TROMBIN, 2017). Pela sua característica de fonte geradora de renda e emprego, a citricultura pode ser uma real alternativa no desenvolvimento sustentável do Nordeste, tanto para atendimento ao mercado de frutas frescas como para processamento de suco (PASSOS *et al.*, 2011; PANTA *et al.*, 2019). Entretanto, os citros estão sujeitos ao ataque de diversos patógenos causadores de doenças, que reduzem a produção e a longevidade dos pomares, afetando a qualidade do produto e em alguns casos causando a morte das plantas (AMORIM *et al.*, 2016).

Nesse sentido, dentre as principais doenças dos citros no Brasil, destacam-se: clorose variegada dos citros (CVC) causada por *Xylella fastidiosa* Wells; huanglongbing (HLB) causada por *Candidatus Liberibacter* spp. (*Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) e *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam)); leprose causada por *Citrus leprosis virus* – (CiLV); pinta preta causada por *Guignardia citricarpa* Kiely; podridão floral causada por espécies do complexo *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) sacc e *Colletotrichum acutatum* Dyko; gomose causada por *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan e *Phytophthora citrophthora* (R.E.Sm. & E.H.Sm.) Leonian; e o cancro cítrico causado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Hasse) (AMORIM *et al.*, 2016).

Dentre as doenças acima relacionadas, atenção especial deve ser dada ao cancro cítrico, visto que os danos causados por essa enfermidade são significativos, sendo um dos maiores problemas fitossanitários presente na citricultura brasileira (FUNDECITRUS, 2021). No Brasil, *X. citri* subsp. *citri* é considerada uma praga quarentenária presente, restrita aos estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Paraná, Roraima, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Maranhão, Ceará e no estado do Piauí (INSTRUÇÃO

NORMATIVA N° 38/2018) (MAPA, 2018), e mais recentemente relatado no estado do Rio Grande do Norte (AMANCIO *et al.*, 2021; PORTARIA SDA N° 616/2022). Dessa forma, *X. citri* subsp. *citri* passou a ser considerada como uma praga de importância econômica potencial, com programa oficial de controle estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

## 2. Cancro cítrico

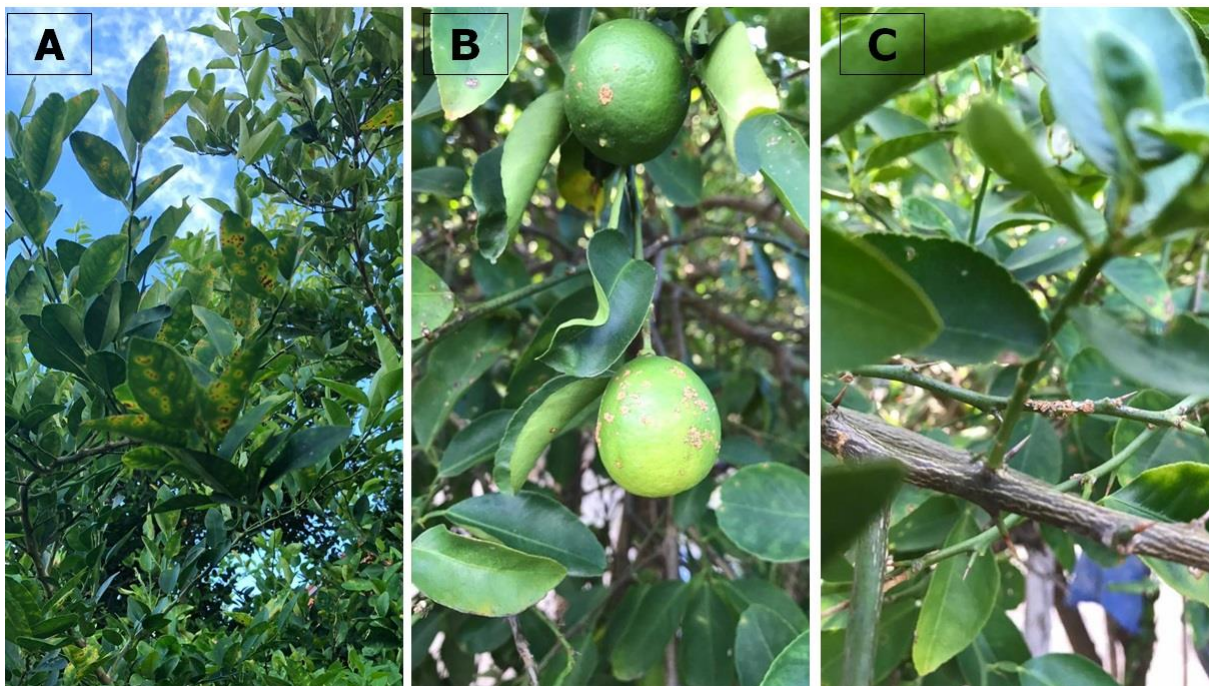
O cancro cítrico foi descrito pela primeira vez em 1915 nos Estados Unidos, quando Haase (1915) verificou a presença dos sintomas característicos da doença em laranja e toranja provenientes da Flórida, Texas e Mississippi. No Brasil, a doença foi detectada pela primeira vez em 1957, na região de Presidente Prudente, São Paulo. Acredita-se que foi introduzida a partir de mudas contaminadas importadas da Ásia (ROSSETTI, 1977), provável centro de origem desta doença (KOIZUMI, 1985). Embora muito esforço tenha sido realizado para impedir a propagação do cancro cítrico no país após os primeiros relatos, principalmente por meio da Campanha Nacional de Erradicação do Cancro Cítrico (CANECC), criada em 1975, novos casos foram sendo identificados nos anos seguintes (BEHLAU *et al.*, 2020a)

No Brasil, esta doença caracteriza-se como uma das mais importantes enfermidades no estado de São Paulo, sendo responsável por danos severos e representando sério potencial de risco ao desenvolvimento da citricultura nacional. Em um levantamento realizado em 2021 em áreas produtoras de laranja na região Sudeste, verificou-se que o cancro cítrico está presente em 15,61% dos talhões de laranja. Esse levantamento também revelou que 10,76% das árvores têm cancro cítrico, o que representa 21 milhões de árvores com a doença (FUNDECITRUS, 2021).

Analisando o impacto das perdas econômico ocasionadas pelo cancro cítrico, Sanches *et al.* (2014) estimaram que a produção esperada em caixas de laranja para o acumulado de 20 anos, na ausência da doença, seria 7,38 bilhões de unidades em um cenário de prevenção da doença. Entretanto, em um cenário oposto, sem controle da doença, essa produção reduziria para cerca de 6,77 bilhões, considerando que a doença segue em expansão e as plantas doentes no campo não são eliminadas ou pulverizadas com cúprico.

Os sintomas característicos do cancro cítrico apresentam-se como lesões circulares, corticosas, salientes, de coloração amarronzada, aspecto eruptivo e rodeadas por anasarca, presentes em folhas, ramos e frutos (GRAÇA *et al.*, 2017; ROSSETTI, 2001). A bactéria penetra principalmente nos tecidos jovens, por meio de aberturas naturais ou ferimentos

(ROSSETTI, 2001). Nas folhas, observam-se lesões salientes nas duas faces e, na maioria das vezes, um halo amarelo circundando a área necrosada (Figura 1A). Com o desenvolvimento da doença pode ocorrer desfolha, queda de frutos e seca de ramos, sendo mais comuns em hospedeiros mais suscetíveis (GOTTWALD *et al.*, 1988; GOTTWALD *et al.*, 1989). Nos frutos é comum surgirem lesões de aspecto pardo, salientes com a presença de um halo amarelo na borda (Figura 1B). Nos ramos, os sintomas ocorrem como lesões salientes de cor parda como aqueles apresentados em folhas e frutos (Figura 1C) (ROSSETI, 2001).



**Figura 1.** Sintomas do cancro cítrico causado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em (A) Folhas; (B) Frutos; e (C) Ramo.

*Xanthomonas citri* subsp. *citri* pode ser introduzida em novas áreas por meio de material propagativo e mudas infectadas, os quais irão originar plantas doentes. A disseminação da bactéria na planta ou entre plantas pode ocorrer por meio de respingos de chuvas aliados ao vento. A longas distâncias a disseminação ocorrer pelo transporte de material propagativo infectado (GOTTWALD *et al.*, 1989).

A penetração da bactéria ocorre por meio de ferimentos causados por equipamentos, espinhos, abrasão de partículas de poeira ou ainda causados pela larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella* Stainton), uma vez que durante a alimentação as larvas rompem a cutícula e a epiderme, expondo o mesófilo foliar, tornando mais susceptível a infecção por *X. citri* subsp. *citri* (GOTTWALD *et al.*, 2002; GOTTWALD *et al.*, 2007). Outra forma de



penetração da bactéria é por meio de aberturas naturais, principalmente os estômatos (GOTTWALD *et al.*, 2002; ROSSETTI, 2001). Após a penetração, a bactéria multiplica-se rapidamente, colonizando os espaços intercelulares e, conseqüentemente, causando a formação dos sintomas característicos (GOTTWALD *et al.*, 2002).

Temperaturas entre 25°C a 30°C em conjunto com a presença de lâmina de água na superfície das folhas, proporcionam condições favoráveis ao desenvolvimento da doença, com período de incubação variando de cinco a sete dias (GOTO, 1992; GOTTWALD *et al.*, 2002). Em condições favoráveis a bactéria pode sobreviver por longos períodos em tecidos de plantas cítricas infectados, constituindo a principal fonte de inóculo (GRAHAM *et al.*, 1987 e 1989), já que a sobrevivência da bactéria é curta em qualquer outro substrato (GRAHAM *et al.*, 1989).

Diversas cultivares ou variedades de citros apresentam diferentes graus de resistência ao cancro cítrico. Via de regra, pomelos, lima ácida e limões são mais susceptíveis ao patógeno. Laranjas doces e laranja azeda apresentam susceptibilidade moderada, enquanto tangerinas são moderadamente resistentes (GOTTWALD *et al.*, 2002). Em um estudo de seis anos realizado no estado do Paraná, Carvalho *et al.* (2015) compararam a susceptibilidade de 186 genótipos ao cancro cítrico, incluindo laranja doce (*C. sinensis*), tangerina (*C. reticulata*), tangerina mediterrânea (*Citrus deliciosa* Tenore), tangerina Clementina (*Citrus clementina* L.), tangerina satsuma (*Citrus unshiu* Marc), laranja azeda (*Citrus aurantium* L.), limão (*Citrus limon* L.), lima doce (*C. aurantifolia*), toranja (*C. paradisi*) e quatro híbridos. Com base nos resultados obtidos, os genótipos mais resistentes, em média, incluíram tangerina satsuma e limão, e os genótipos mais susceptíveis foram toranja e lima doce. Os genótipos de tangerina, laranja azeda, tangerina mediterrânea e laranja doce apresentaram severidade intermediária, porém nenhum genótipo foi imune. Gonçalves-Zuliani *et al.* (2016) ao avaliarem um método de inoculação em folhas destacadas em nove genótipos de *C. sinensis* para comparar a resistência a *X. citri* subsp. *citri*, verificaram que a variedade pêra IAC foi a mais resistente ao patógeno, enquanto a variedade Washington foi a mais susceptível. Ainda segundo os autores, a resistência na variedade pêra IAC pode estar envolvida com as aberturas estomáticas menores em conjunto com uma maior quantidade de exsudados foliares tóxicos a bactéria.

No Brasil, desde que foi detectada pela primeira vez em 1957, o cancro cítrico foi controlado com medidas de exclusão e erradicação como estratégia de evitar a disseminação da doença para novas áreas, buscando eliminação dos focos identificados (BEHLAU *et al.*, 2017). Entretanto, desde 2016, a partir da Instrução Normativa nº 37, de 5 de setembro de

2016, outras estratégias de controle foram permitidas, como a adoção do Sistema de Mitigação de Risco (SMR), que visa diminuir a quantidade de inóculo nos pomares e controlar a disseminação do patógeno e, simultaneamente, seguir às exigências fitossanitárias de países importadores (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Embora esse regulamento conciliasse com a situação da doença no país e mantivesse o cancro cítrico como doença quarentenária, algumas decisões prejudicaram os produtores de frutas frescas. Dessa forma, para atender à demanda, em 2018, foi criada a Instrução Normativa nº 21, de 25 de Abril de 2018, seguindo os princípios estabelecidas na legislação anterior (MAPA, 2018). Atualmente essa é a legislação que regulamenta o controle do cancro cítrico no país e permiti que cada unidade federativa adote um status diferente quando da presença e incidência da doença em pomares de citros (BEHLAU *et al.*, 2021a). Nessa perspectiva, áreas sob SMR, passaram a implementação de medidas integradas que visam proteger os frutos de infecções sem a necessidade de erradicar as plantas afetadas.

Dentre as principais estratégias de manejo do cancro cítrico, destacam-se: pulverizações com produtos à base de cobre (oxicloreto de cobre, hidróxido de cobre e óxido cuproso), em número variável, de acordo com a incidência de condições ambientais favoráveis à bactéria; dar preferência a cultivares com maior nível de resistência ao cancro cítrico; realizar o manejo adequadamente da adubação, principalmente a nitrogenada; eliminação de pequenos ramos cujas folhas apresentem sintomas da doença, eliminar frutos contaminados; realizar o controle periódico do minador dos citros; utilizar quebra-ventos e proceder a desinfestação de máquinas e equipamentos (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Em um estudo de três anos, Behlau *et al.* (2021b) avaliaram o efeito isolado e combinado de quebra-vento, aplicação de cobre e controle da larva minadora no manejo do cancro cítrico em laranja doce. Isoladamente as aplicações de cobre apresentaram maior contribuição para o controle do cancro cítrico quando comparado ao uso isolado de quebra-vento e controle da larva minadora. Porém, o uso combinado de pulverizações de cobre e quebra-vento contribuíram com a redução de 60% na incidência da doença, bem como aumento do rendimento das plantas em comparação com as parcelas não manejadas.

### **3. *Xanthomonas citri* subsp. *citri***

*Xanthomonas citri* subsp. *citri* foi inicialmente classificada por Hasse, em 1915, como *Pseudomonas citri* Clara Hasse. Em 1916, Doidge. (1916) propôs que a bactéria fosse reclassificada como *Bacterium citri* (Hasse) Doidge. Alguns anos depois a bactéria foi

renomeada como *Bacillus citri* (Hasse) Holland (HOLLAND, 1920) e posteriormente de *Phytomonas citri* (Hasse) Bergey (BERGEY *et al.*, 1923). Com a criação do gênero *Xanthomonas* Dowson, em 1939, foi reclassificada como *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson (DOWSON, 1939). Em 1978, Young *et al.* Propuseram alterações no sistema de classificação de bactérias fitopatogênicas e oficializaram o uso do termo patovar, o qual foi designado para classificação infrasubspecífica provisória de fitobactérias até que uma nova classificação pudesse ser realizada com base em critérios mais sólidos. Nessa ocasião, a bactéria passou a ser classificada como *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye (DYE *et al.*, 1980).

Com os avanços das técnicas moleculares, principalmente por meio de estudos de hibridização DNA-DNA em conjunto com características fenotípicas e patogênicas, *X. campestris* pv. *citri* foi sofrendo novas alterações na sua taxonomia. Em 1995, uma nova classificação foi proposta para o gênero *Xanthomonas* e, nesse momento, foi reclassificada como *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse) Vauterin (VAUTERIN *et al.*, 1995). Em 2005, baseado em análises do espaço intergênico 16S-23S, AFLP e homologia DNA-DNA o agente causal do cancro cítrico passou a ser designado como *X. citri* subsp. *citri*, a qual é aceita até o presente momento (SCHAAD, *et al.*, 2005 e 2006).

Quanto às características morfológicas, culturais, bioquímicas e fisiológicas, *X. citri* subsp. *citri* caracteriza por apresentar células em formato de bastonete, gram negativas e com um único flagelo polar (GOTO; HYODO, 1985). Apresenta colônias mucoides em função da produção de exopolissacarídeos (EPS), principalmente a goma xantana, de coloração amarelada em função da produção de um pigmento ligado a membrana celular, denominado xanthomonadina (JANSSON *et al.*, 1975). Não utiliza asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio, apresenta oxidase negativa, catalase positiva, não redutora de nitrato, positiva para hidrólise do amido, positiva para liquefação de gelatina, positiva para teste de arginina dihidrolase e positiva para hidrólise de Tween 80 (BHARDWAJ *et al.*, 2014; ISOKAR, *et al.*, 2020). Em meio de cultura sólido, *X. citri* subsp. *citri* apresenta crescimento ótimo em temperatura de 30°C e PH ótimo de 7,0 com decréscimo do crescimento em temperaturas de 5°C e 40°C e pH 3, 4 e 9 (ISOKAR, *et al.*, 2020).

No que diz respeito a gama de hospedeiro, *X. citri* subsp. *citri* possui patogenicidade, restrita a plantas da família Rutaceae (LEYNS *et al.*, 1984). Civerolo (1984) listou uma série de plantas da família Rutaceae que podem servir como hospedeiras dessa bactéria. Entre as variedades comerciais de citros e porta enxertos, o cancro cítrico é mais severo em toranja (*C. paradisi*), lima comum (*C. aurantiifolia*) e laranja trifoliata (*Poncirus trifoliata* L.). Entretanto, Kalita *et al.* (1997) relataram que mentrasto (*Ageratum conyzoides* L.), uma

planta daninha muito frequentemente encontrada em pomares de citros na Índia, poderia servir como hospedeira de *X. citri* subsp. *citri*. Até hoje, este é o único relato de uma planta não pertencente a família Rutacea como hospedeira desta bactéria.

#### 4. Resistência de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* a cúpricos

O controle químico com uso de produtos cúpricos, como oxiclóreto de cobre, sulfato de cobre, hidróxido de cobre e óxido cuproso, é uma das principais formas de minimizar as perdas causadas pelo cancro cítrico. O cobre age na proteção do tecido vegetal quando aplicados em folhas jovens e frutos, prevenindo ou dificultando a penetração de *X. citri* subsp. *citri* por aberturas naturais ou ferimentos, o que é tóxico quando absorvido em alta concentração pelas células bacterianas (MENKISSOGLU; LINDOW, 1991). Entretanto, para evitar danos, o seu nível intracelular deve ser controlado, e para isso, as bactérias desenvolveram sistemas para se proteger da concentração excessiva de cobre (VOLOUDAKIS *et al.*, 2005), contribuindo com a emergência de isolados resistentes a cobre (Cu<sup>R</sup>). Uma vez que a Cu<sup>R</sup> é adquirida, a pressão colocada pelas aplicações contínuas de sprays de cobre contribui com o aumento gradativo das formas resistentes, comprometendo a eficácia das aplicações de cobre (BEHLAU *et al.*, 2013; SUNDIN; JONES; FULBRIGHT, 1989).

Atualmente, já foram relatadas várias bactérias fitopatogênicas Cu<sup>R</sup>, incluindo espécies de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ((Okabe) Young, Dye & Wilkie), *Xanthomonas euvesicatoria* (Jones, Lacy, Bouzar, Stall & Schaad), *Xanthomonas perforans* (Jones, Lacy, Bouzar, Stall & Schaad), *Xanthomonas gardneri* (Jones *et al.*) Morinière *et al.* (BEHLAU *et al.*, 2013), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Doidge) (BASIM *et al.*, 2005; VOLOUDAKIS *et al.*, 2005), *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* (Pierce) Vauterin (BEHLAU *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 1994), *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* (Schaad *et al.*) Constantin (BEHLAU *et al.*, 2011) e *X. citri* subsp. *citri* (CANTEROS *et al.*, 1999; RICHARD *et al.*, 2017a).

Primeiros relatos do desenvolvimento de resistência de *X. citri* subsp. *citri* Cu<sup>R</sup> foram detectados na Argentina em meados da década de 1990 (CANTEROS, 1999) e recentemente em território francês (RICHARD *et al.* 2017a, 2017b). No Brasil, não há relatos de *X. citri* subsp. *citri* Cu<sup>R</sup>, porém testes *in-vitro* detectaram isolados tolerantes a cobre (Cu<sup>T</sup>) dessa bactéria ao sulfato de cobre em níveis de 150-200 mg/L no estado do Paraná (MARIN *et al.*, 2019).

Na maioria dos isolados de *Xanthomonas* caracterizados como Cu<sup>R</sup>, a resistência ao cobre é conferida pelos genes *CopLAB* (BEHLAU *et al.*, 2013). Esses genes foram detectados em plasmídeos (BEHLAU *et al.*, 2012; BEHLAU *et al.*, 2013; BENDER *et al.*, 1990; COOKSEY, 1987; COOKSEY, 1990; STALL; LOSCHKE; JONES, 1986), o que facilita a sua circulação entre diferentes espécies bacterianas e transferência para isolados sensíveis a cobre (Cu<sup>S</sup>) por meio de processo de conjugação (BEHLAU *et al.*, 2011, 2012, 2013). Entretanto, genes de resistência ao cobre em algumas bactérias, tais como espécies de *Pseudomonas* (BEHLAU *et al.*, 2013; LIM; COOKSEY, 1993) e *Xanthomonas* (BASIM *et al.*, 2005; BEHLAU *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 1994), podem também estar localizados no cromossomo. É pouco provável que as bactérias tenham adquirido resistência ao cobre por meio de mutações espontâneas, porque esta resistência é regulada por vários genes, nestes organismos (BEHLAU *et al.*, 2013; COOKSEY, 1990). A resistência ao cobre conferida por plasmídeos tem sido comumente estudada nos gêneros *Pseudomonas* e *Xanthomonas*, mostrando que esses sistemas são relacionados e altamente homólogos (VOLOUDAKIS *et al.*, 1993). Em isolados de espécies desses gêneros com resistência ao cobre foram descritos diversos operons, denominados *copA*, *copB*, *copC*, *copD*, *copF*, *copG*, *copL* e *copM* (BEHLAU *et al.*, 2011; COOKSEY, 1990; SILVER; PHUNG, 1996; VOLOUDAKIS *et al.*, 2005).

Em *Xanthomonas*, o mecanismo de resistência ao cobre e o papel do grupo de genes *copLAB* continuam sem ser totalmente elucidados. Estudos indicam que o sequestro e acumulação de cobre celular é o principal mecanismo de resistência ao cobre em *Xanthomonas* spp., e que o gene *copL* regula a expressão dos genes *copA* e *copB*, que codificam para proteínas de ligação de cobre (BEHLAU *et al.*, 2011; BEHLAU *et al.*, 2013; COOKSEY, 1987; VOLOUDAKIS *et al.*, 2005). Os genes *copA* e *copC* codificam proteínas periplasmáticas que se ligam aos íons cobre e são responsáveis pela resistência parcial de *P. syringae* ao cobre. Os genes *copB* e *copD* codificam proteínas de membrana externa e interna, respectivamente, necessárias para a resistência completa (COOKSEY, 1993). Entretanto, em *X. citri* subsp. *citri* apenas os genes *copL*, *copA* e *copB* mostraram-se essenciais para a resistência ao cobre (BEHLAU *et al.* 2011).

Embora diversos estudos tenham sido realizados na detecção de isolados de *X. citri* subsp. *citri* Cu<sup>R</sup>, não há relatos de estudos com essa perspectiva realizados na região Nordeste do Brasil, visto expansão do cancro cítrico nessa região nos últimos anos. Portanto, é importante compreender o perfil de tolerância ao cobre da população presente nessa região.

Estas informações ajudarão a prever o risco de desenvolvimento de resistência em *X. citri* subsp. *citri*, bem como evitar o risco de surgimento.

## 5. Diversidade genética de *Xanthomonas* spp. causadoras de cancro cítrico

As cancroses em citros, causadas por *Xanthomonas* spp. pertencem a uma linhagem muito ampla de bactérias presentes em todo mundo. Atualmente, sabe-se que existem diferentes tipos e subtipos, dentro do gênero *Xanthomonas*, capazes de causarem cancro em citros: *X. citri* subsp. *citri* tipo A subtipos (A\*, A<sup>w</sup>) e *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (Schaad) Constantin (tipo B e C) (BEHLAU *et al.*, 2020; FERENGE *et al.*, 2018; IBRAHIM *et al.*, 2019) (Tabela 1). Um tipo D de cancro cítrico também foi relatado na área de Colima, no México, na década de 1980 (RODRÍGUEZ *et al.* 1985), mas posteriormente foi descoberto como sendo causado por *Alternaria limicola* E.G. Simmons & M.E. Palm e não foi considerado (CIVEROLO, 1994). *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*, agente etiológico da mancha bacteriana dos citros, também foi descrita inicialmente como causadora de cancro em citros. Entretanto, devido a diferenças quanto a sintomatologia fez com que a bactéria fosse desconsiderada. (BEHLAU *et al.*, 2020; GRAHAM; GOTTWALD 1990; SCHUBERT *et al.* 2001) (Tabela 1).

A mais comum e severa é a forma asiática tipo A, distribuída mundialmente, sendo patogênica a todas as variedades comerciais de citros. Já *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* é restrita à América do Sul e possui limitada gama de hospedeiro. Embora mais severa em limões (*C. limon*), a cancrose B também causa doença em lima ácida, laranja azeda (*C. aurantium*) e pomelo (*C. paradisi*) (BEHLAU *et al.*, 2020; IBRAHIM *et al.*, 2019; GRAHAM; GOTTWALD 1990; SCHUBERT *et al.*, 2001).

Isolados pertencentes ao subtipo A\* foram obtidos de *C. aurantifolia* na década de noventa em vários países da Ásia e da Etiópia, e foram reconhecidas como um subtipo semelhante, mas distinto dos isolados do tipo A (COOK, 1988; VERNIERE *et al.* 1998; DERSO *et al.*, 2009). Isolados pertencentes ao subtipo A\* possuem patogenicidade diferente em comparação aos isolados do tipo A, visto capacidade de causarem sintomas atípicos de cancro em *C. paradisi* (VENIÈRE *et al.*, 1998). Dessa maneira, estes isolados são alocados dentro de um grupo a parte, denominado subtipo A\*.

Posteriormente, na Flórida, em 2000, isolados com características fisiológicas e genéticas distintas, permitiram identificar um grupo diferente de todos os outros isolados identificado dentro do tipo A até então. A nova variante foi denominada A<sup>w</sup>, em referência ao

local de identificação (RYBAK *et al.* 2009; SUN *et al.* 2004). Posteriormente, diversos estudos baseados em características patogênicas e estudos moleculares foram desenvolvidos para elucidar as diferenças entre os subtipos A (VENIÈRE *et al.*, 1998; CUBERO; GRAHAM, 2004; NGOC *et al.* 2010; RYBAK *et al.* 2009; SUN *et al.* 2004).

**Tabela 1.** Espécies, tipos e subtipos mais relevantes de *Xantomomonas* spp. causadoras de cancro em citros e distribuição global. Adaptado de Behlau *et al.* (2020).

Denominação	Patogenicidade	Distribuição
<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i> Tipo A	Todas as espécies cítricas	Em todo o mundo
<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i> Subtipo A*	A maioria causa cancro em todas as espécies cítricas. Alguns isolados são patogênicos apenas em <i>Citrus aurantifolia</i>	Ásia
<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i> Subtipo A <sup>w</sup>	<i>C. aurantifolia</i> e <i>Citrus macrophylla</i>	Ásia e EUA (Flórida)
<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> tipo B	Todas as espécies cítricas	Argentina, Paraguai e Uruguai
<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> tipo C	<i>C. aurantifolia</i> , citrumelo Swingle e <i>C. latifolia</i>	Brasil (São Paulo)

*Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B foi descrita pela primeira vez na Argentina em 1929 e no Paraguai em 1932 (CONDADO, 1942). Porém, somente em 1967, o cancro cítrico foi oficialmente relatado no Paraguai (ROSSETTI, 1977). Nessa mesma década, uma nova forma de cancro cítrico, inicialmente denominado tipo C, foi observada pela primeira vez no estado de São Paulo, Brasil, e foram diferenciadas dos tipos A e B com base características patológicas, fisiológicas e sorológicas (NAMEKATA; OLIVEIRA, 1972; BEHLAU *et al.*, 2020). As origens do cancro cítrico tipos B e C nunca foram bem determinadas. Ambas as formas de *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* causam sintomas semelhantes aos do cancro, mas são menos agressivas do que os isolados que causam a forma asiática. Embora menos agressivas, os isolados do tipo B causam sintomas de cancro em todas as espécies de citros (GOCHEZ *et al.*, 2018; FONSECA *et al.*, 2019). Recentement, Fonseca *et al.* (2019) em um estudo de filogenômica mostraram que os genomas de *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B e C carecem de vários genes chaves envolvidos na infecção no hospedeiro,

o que ajuda a explicar a agressividade atenuada e a predominância da forma asiática sobre os tipos B e C.

Por muitos anos, desde a primeira descoberta, a ocorrência do tipo C ficou restrita a alguns municípios do estado de São Paulo, não causando prejuízos econômicos significativos. Essa forma nunca foi encontrada na Argentina ou em qualquer outro lugar do mundo (BEHLAU *et al.*, 2020).

## **6. Técnicas empregadas para caracterização polifásica de *Xanthomonas* spp.**

Atualmente para classificação de microrganismos se faz uso de vários métodos que possibilite a completa resolução dos táxons (PRAKASH *et al.*, 2007), denominado caracterização polifásica. Esse conjunto de técnicas integra diferentes tipos de dados e informações (genotípico, fenotípico e fisiológica) sobre o táxon, constituindo-se essencialmente um sistema taxonômico consensual (VANDAMME *et al.*, 1996).

Nesse sentido, a caracterização da variabilidade metabólica de isolados bacterianos pode permitir que determinadas características sejam utilizadas como marcadores metabólicos, úteis para diferenciação e classificação de isolados (VERNIERE *et al.*, 1993). Dentre os sistemas mais utilizados para descrição do perfil metabólico de bactérias, destacam-se aqueles desenvolvidos pelo Biolog Inc. (Hayward, Califórnia). Esses sistemas têm sido empregados para gerar perfis metabólicos e demonstrar a variabilidade existentes entre isolados de *Xanthomonas* spp. (CONSTANTIN *et al.*, 2016), porém é importante mencionar que tais sistemas raramente permitem uma identificação acurada em níveis infraespecíficos (SCHAAD; JONES, CHUN, 2001). Portanto, a identificação de bactérias baseada apenas no uso dessa técnica apresenta baixa confiabilidade, sendo necessários a utilização de outros métodos (VERNIERE *et al.*, 1993).

O controle químico é um dos principais métodos utilizados no manejo de doenças de plantas. Entretanto, a ocorrência na natureza de isolados resistentes devido ao uso contínuo de produtos químicos vêm se tornando um grande problema (CANTEROS, 1999). Desta forma, quando um conjunto de isolados de uma mesma bactéria são testados quanto a sensibilidade a um produto químico, por exemplo um cúprico, há tendências de se traçar um perfil característico quanto a sensibilidade. Recentemente, Marin *et al.* (2019) realizaram um estudo no Paraná e revelaram a existência de isolados de *X. citri* subsp. *citri* Cu<sup>T</sup>, mas não identificaram isolados Cu<sup>R</sup>.



A caracterização patológica também é outra de forma de traçar um perfil de isolados de *X. citri* subsp. *citri* quanto a capacidade de causar doenças em determinadas cultivares indicadoras. Na década de 90, Venière *et al.* (1998) diferenciaram os subtipos A\* e A<sup>w</sup>, pertencentes ao patótipo A, por meio de teste de patogenicidade em cultivares diferenciadoras, observando que isolados pertencentes ao subtipo A\* causavam sintomas típicos de cancro em *C. aurantifolia*, mas não em *C. paradisi*. Mais tarde, Sun *et al.* (2004) observaram que isolados pertencentes ao subtipo A<sup>w</sup> diferenciavam do isolados do Subtipo A\* em sua capacidade de causar reação de hipersensibilidade (HR) em *C. paradisi* e *C. sinensis*. No entanto, mais recentemente Pruvost *et al.* (2014) desenvolveram uma técnica de genotipagem (Multilocus Variable Number of Tandem Repeat Analysis (MLVA) que pode discriminar diferentes subtipos de *X. citri* subsp. *citri*. Porém, essa técnica requer equipamentos específicos e pessoal bem treinado.

Várias técnicas baseadas em PCR são aplicadas para estudar diversidade e variabilidade genética e os relacionamentos taxonômicos e filogenéticos das espécies e patovares que compõe o gênero *Xanthomonas*. Sequenciamento da região 16S do DNA ribossomal (HAUBEN *et al.*, 1997), análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificado (amplified fragment length polymorphism – AFLP) (RADEMAKER *et al.*, 2000), PCR com base em sequências repetitivas (rep-PCR) (RADEMAKER *et al.*, 2000; RADEMAKER *et al.*, 2005), MLSA (YOUNG *et al.*, 2008) e análises de DNA polimórfico amplificado ao acaso (Random Amplified Polymorphic DNA - RAPD) (REZAEI *et al.*, 2012), são amplamente utilizados nas pesquisas.

Algumas técnicas de “fingerprinting” do DNA genômico, tais como AFLP e rep-PCR, além de serem extremamente importantes para estudos de diversidade e variabilidade genética, também podem ser usadas para inferir relações genotípicas ou taxonômicas entre fitobactérias. A principal evidência de que apoia esta hipótese deriva de comparações detalhadas entre grupos genotípicos gerados por meio de “fingerprinting” e análise de hibridização DNA-DNA (RADEMAKER *et al.*, 2005).

A análise de rep-PCR foi desenvolvida com base na ocorrência de três sequências repetitivas e conservadas ao longo do genoma de diversas bactérias. Essas sequências são chamadas de REP (Repetitive Extragenic Palindromic), ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) e elementos BOX, e são utilizados para gerar “fingerprints” que refletem a estrutura genômicas de espécies de *Xanthomonas* (ARSHADI *et al.*, 2013; LOUWS *et al.*, 1994; REZAEI *et al.*, 2012). Adicionalmente, rep-PCR caracteriza-se como

uma técnica simples, rápida e reprodutível para identificação de isolados bacterianos (LOUWS *et al.*, 1994; LOUWS *et al.*, 1999; STACKEBRANDT *et al.*, 2002).

Utilizando análise de rep-PCR Arshadi *et al.* (2013) avaliaram um total de 25 amostras de cancro cítrico de diferentes partes da Malásia Ocidental. A análise de agrupamento usando os padrões de bandas combinados de ERIC e BOX-PCR dividiu claramente os isolados em diferentes agrupamentos de acordo com sua origem geográfica, mas não com sua espécie hospedeira. Uma quantidade relativamente alta de diversidade genética foi observada entre os isolados, indicando que pode haver distintos tipos da bactéria presentes na Malásia. Para investigar a diversidade genética de 25 isolados de *X. citri* subsp. *citri* oriundos de diferentes regiões no Irã, Rezaei *et al.* (2012) utilizaram análises de rep-PCR e RAPD e concluíram que a origem geográfica dos isolados da província de Sistão-Baluchistão é diferente da origem geográfica dos isolados de outras províncias presentes no Irã e que a análise de rep-PCR em comparação com RAPD é mais específica e confiável.

A técnica MLSA, baseada em Análises de Sequências Multilocus, também vem sendo utilizada para o delineamento mais refinado de espécies de *Xanthomonas* e outras fitobactérias (ALMEIDA *et al.*, 2010; AH-YOU *et al.*, 2009; YOUNG *et al.*, 2008). Nessa técnica sequências de nucleotídeos de vários genes são comparados, gerando informações sobre a diversidade e o relacionamento de táxons por meio de análises filogenéticas (NASER *et al.*, 2005).

Os genes mais utilizados em MLSA são geralmente os “genes housekeeping”, ou seja, aqueles que conferem funções metabólicas básicas essenciais e apresentam-se suficientemente conservados para realização de inferência filogenéticas (ALMEIDA *et al.*, 2010). Diversos “genes housekeeping” podem ser utilizados em MLSA (RODRIGUEZ-R *et al.*, 2012), destacando-se: *atpD* (subunidade  $\beta$  da F1-Fo ATP sintase), *dnaK* (proteína de choque térmico, Hsp 70), *gryB* (subunidade  $\beta$  da girasse do DNA), *fyuA* (receptor dependente do sistema TonB) e *rpoD* (fator sigma RNA polimerase), os quais foram empregados de forma bem-sucedida para delimitar isolados de *Xanthomonas* spp. (AH-YOU *et al.*, 2009; YOUNG *et al.*, 2008).

Ferraz *et al.* (2018) utilizaram MLSA com os genes *dnaK*, *gryB*, *fyuA* e *rpoD* para identificar um novo patovar associado a eucalipto. Usando as sequências dos genes concatenadas alocaram os isolados em um clado bem definido, indicando que os isolados pertenciam a espécie *Xanthomonas axonopodis*. Com base em características genéticas, patogênicas, bioquímicas e fisiológicas foi proposto um novo patovar nominado *X.*

*axonopodis* pv. *eucalypto*. De acordo com Young *et al.* (2008), MLSA apresenta-se como uma ferramenta robusta que pode ser útil para diferenciação de espécies *Xanthomonas*.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi realizar uma caracterização polifásica de isolados de *X. citri* subsp. *citri* obtidos do Nordeste do Brasil. Assim, neste trabalho visamos (i) montar uma coleção de isolados de *X. citri* subsp. *citri* do Nordeste brasileiro; (ii) investigar e relatar existência do cancro cítrico no estado do Rio Grande do Norte; (iii) caracterizar a variabilidade genética de isolados de *X. citri* subsp. *citri* obtido do Nordeste brasileiro por meio de rep-PCR; (iv) realizar a identificação molecular desses isolados por meio de análise da sequência multilocos (MLSA); (v) realizar a caracterização patológica dos isolados utilizando diferentes cultivares diferenciadoras; (vi) caracterizar os isolados utilizando testes bioquímicos por meio do sistema Biolog®; (vii) determinar a sensibilidade a cúpricos de isolados de *X. citri* subsp. *citri*, investigando os genes envolvidos na resistência; (viii) testar a capacidade de plantas não pertencentes a família Rutacea servirem como hospedeiras desses isolados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AH-YOU, N.; GAGNEVIN, L.; GRIMONT, P. A. D.; BRISSE, S.; NESME, X.; CHIROLEU, F.; BUI THI NGOC, L.; JUEN, E.; LEFEUVRE, P.; VERNIÈRE, C.; PRUVOST, O. Polyphasic characterization of xanthomonads pathogenic to members of the Anacardiaceae and their relatedness to species of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, n. 2, p. 306-318, 2009.
- ALMEIDA, C. O.; PASSOS, O. S. **Citricultura brasileira em busca de novos rumos: Desafios e oportunidades na região Nordeste**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011. p. 9-10.
- ALMEIDA, N. F.; YAN, S. C.; CAI, R. M.; CLARKE, C. R.; MORRIS, C. E.; SCHAAD, N. W.; SCHUENZEL, E. L.; LACY, G. H.; SUN, X. A.; JONES, J. B.; CASTILLO, J. A.; BULL, C. T.; LEMAN, S.; GUTTMAN, D. S.; SETUBAL, J. C.; VINATZER, B. A. PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 100, n. 3, p. 208-215, 2010.
- AMANCIO, L.C.S.; BAIA, A.D.B.; SOUZA, E.B.; SALES-JUNIOR, R.; NEGREIROS, A.M.P.; GAMA, M.A.S. First Report of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Causing Citrus Canker on Lime in Rio Grande do Norte, Brazil. **Plant disease**, Saint Paul, v. 105, n. 12, p. 4148, 2021.
- ARSHADI, F.; SIJAM, K.; AWANG, Y. B. Genetic diversity of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, causal agent of citrus canker. **Journal of Plant Protection Research**, Poznań, v. 53, n. 4, p. 312-316, 2013.
- BASIM, H.; MINSAVAGE, G. V.; STALL, R. E.; WANG, J. F.; SHANKER, S.; JONES, J. B. Characterization of a unique chromosomal copper resistance gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 12, p. 8284-8291, 2005.
- BASTOS, D. C.; FERREIRA, E. A.; PASSOS, O. S.; SÁ, J. F.; ATAÍDE, E. M.; CALGARO, M. Cultivares copa e porta-enxertos para a citricultura brasileira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 5, n. 281, p. 36-45, 2014.
- BEHLAU, F. An overview of citrus canker in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 46, n. 1, p. 1-12, 2021a.
- BEHLAU, F.; BELASQUE JR, J.; LEITE JR, R. P.; FILHO, A. B.; GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCANDELAI, L. H. M.; PRIMIANO, I. V.; BASSANEZI, R. B.; AYRES, A. J. Relative Contribution of Windbreak, Copper Sprays, and Leafminer Control for Citrus Canker Management and Prevention of Crop Loss in Sweet Orange Trees. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 105, n. 8, p. 2097-2105, 2021b.
- BEHLAU, F.; CANTEROS, B. I.; JONES, J. B.; GRAHAM, J. H. Copper resistance genes from different xanthomonads and citrus epiphytic bacteria confer resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 133, n. 4, p. 949-963, 2012.

BEHLAU, F.; CANTEROS, B. I.; MINSAVAGE, G. V.; JONES, J. B.; GRAHAM, J. H. Molecular characterization of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 12, p. 4089-4096, 2011.

BEHLAU, F.; GOCHEZ, A. M.; JONES, J. B. Diversity and copper resistance of *Xanthomonas* affecting citrus. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 45, p. 1-13, 2020.

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

BEHLAU, F.; SALA, I.; BASSANEZI, R. **Cancro cítrico: medidas essenciais de controle**. 3. ed. Araraquara: Fundecitrus, 2017. 24 p.

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**, Washington, v. 56, n. 1, p. 170-175, 1990.

BERGEY, D. H.; HARRISON, F. C.; BREED, R. S.; HAMMER, B. W.; HUNTOON, F. M. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 1 ed. Baltimore, Estados Unidos: Williams & Wilkins Company, 1923. 442p.

BHARDWAJ, N. R.; UPADHYAY, V.; NAGAR, M. Biochemical characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, causal agent of citrus canker. **The Bioscan**, Jharkhand, v. 9, n. 1, p. 429-431, 2014.

CANTEROS, B.I. Copper resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. In: MAHADEVAN, A. (ed.) **Plant pathogenic bacteria proceedings of the international society of bacteriology centre for advanced study in botany.**, Chennai: University of Madras, Chennai, pp 455-459, 1999,. P. 455-459.

CARVALHO, S. A.; NUNES, W. M. C.; BELASQUE JR, J.; MACHADO, M. A.; CROCE-FILHO, J.; BOCK, C. H.; ABDO, Z. Comparison of Resistance to Asiatic Citrus Canker Among Different Genotypes of Citrus in a Long-Term Canker-Resistance Field Screening Experiment in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 99, n. 2, p. 207-218, 2015.

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

CONDADO, C. (1942) Cancrosis del limonero. INTA, Bella Vista. COOK, A. Association of citrus canker pustules with leaf miner tunnels in North Yemen. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 72, p. 546-546, 1988.

CONSTANTIN, E. C.; CLEENWERCK, I.; MAES, M.; BAEYEN, S.; VAN MALDERGHEM, C.; DE VOS, P.; COTTYN, B. Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. **Plant pathology**, Oxford, v. 65, n. 5, p. 792-806, 2016.

COOK, A. Association of citrus canker pustules with leaf miner tunnels in North-Yemen. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 72, n. 6, p. 546-546, 1988.

COOKSEY, D. A. Characterization of a copper resistance plasmid conserved in copperresistant strains of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 2, p. 454- 456, 1987.

COOKSEY, D. A. Copper uptake and resistance in bacteria. **Molecular microbiology**, Salem, v. 7, n. 1, p. 1-5, 1993.

COOKSEY, D. A. Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, n. 1, p. 201-219, 1990.

CUBERO, J.; GRAHAM, J. H. The leucine-responsive regulatory protein (lrp) gene for characterization of the relationship among *Xanthomonas* species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 429–437, 2004.

DERSO, E.; VERNIÈRE, C.; PRUVOST, O. First report of *Xanthomonas citri* pv. *Citri-a\** causing citrus canker on lime in Ethiopia. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 93, p. 203–203, 2009.

DOIDGE, E. M. Citrus canker in South Africa. **South African Fruit Grower**, v. 3, p. 265 268, 1916.

DOWSON, W. J. On the systematic position and generic names of the Gram negative bacterial plant pathogens. **Zentralblatt für Bakteriologie**, Stuttgart, v. 100, p. 177-193, 1939.

DYE, D. W.; BRADBURY, J. F.; GOTO, M.; HAYWARD, A. C.; LELLIOT, R. A.; SCHROTH, M. N. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. **Review of Plant Pathology**, Farnham Royal, n. 59, p. 153–168, 1980.

FERRAZ, H. G. M.; BADEL, J. L.; GUIMARÃES, L. M. S.; REIS, B. P.; TÓTOLA, M. R.; GONÇALVES, R. C.; ALFENAS, A. C. *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalyptorum* pv. nov. causing bacterial leaf blight on eucalypt in Brazil. **The plant pathology journal**, Seoul, v. 34, n. 4, p. 269, 2018.

FERREIRA, J. T. P.; FERREIRA, E. P.; PANTALEÃO, F. S.; ALBUQUERQUE, K. N. Citricultura no Estado de Alagoas – Um estudo de caso no município de Santana do Mundaú AL. **Agropecuária científica no semiárido**, Campina Grande, v. 9, n. 1, p. 125-134, 2013.

FERENCE, C. M.; GOCHEZ, A. M.; BEHLAU, F.; WANG, N.; GRAHAM, J. H.; JONES, J. B. Recent advances in the understanding of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* pathogenesis and citrus canker disease management. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 19, n. 6, p. 1302, 2018.

FONSECA, N. P.; PATANÉ, J. S. L.; VARANI, A. M.; FELESTRINO, É.B.; CANESCHI, W. L.; SANCHEZ, A. B.; CORDEIRO, I. F.; LEMES, C. G. C.; ASSIS, R. A. B.; GARCIA, C. C. M.; BELASQUE JR, J.; MARTINS JR, J.; FACINCANI, A. P.; FERREIRA, R. M.; JACIANI, F. J.; ALMEIDA, N. F.; FERRO, J. A.; MOREIRA, L. M.; SETUBAL, J. C. Analyses of seven new genomes of *xanthomonas citri* pv. *aurantifolii*

strains, causative agents of citrus canker B and C, show a reduced repertoire of pathogenicity-related genes. **Frontiers in microbiology**, Bristol, v. 10, p. 2361, 2019a.

Fundo de Defesa da Citricultura. 2021. **Levantamento da incidência das doenças dos citros: Greening, CVC e cancro cítrico** / Fundo de Defesa da Citricultura. Araraquara: Fundecitrus. Disponível em: <

[https://www.fundecitrus.com.br/pdf/levantamentos/Relatorio\\_levantamento\\_de\\_doencas\\_2021-greening\\_CVC\\_e\\_cancro\\_citrico.pdf](https://www.fundecitrus.com.br/pdf/levantamentos/Relatorio_levantamento_de_doencas_2021-greening_CVC_e_cancro_citrico.pdf) >. Acesso em: 30 jun. 2022.

GOACHEZ, A. M.; HUGUET-TAPIA, J. C.; MINSAVAGE, G. V.; SHANTARAJ, D.; JALAN, N.; STRAUß, A.; LAHAYE, T.; WANG, N.; CANTEROS, B.; JONES, J.B.; POTNIS, N. Pacbio sequencing of copper-tolerant *Xanthomonas citri* reveals presence of a chimeric plasmid structure and provides insights into reassortment and shuffling of transcription activator-like effectors among *X. citri* strains. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, p. 16, 2018.

GONÇALVES-ZULIANI, A. M. O.; CARDOSO, K. A. K.; JUNIOR, J.B.; ZANUTTO, C. A.; HASHIGUTI, H. T.; BOCK, C. H.; NAKAMURA, C. V.; NUNES, W. M. C. Reaction of detached leaves from different varieties of Sweet orange to inoculation with *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 42, n. 2, p. 125-133, 2016.

GOTO, M. Citrus canker. In: KUMAR, J.; CHAUBE, H. S.; SINGH, U. S.; MUKHOPADHYAY, A. N. (Ed.). **Plant disease of international importance**. Englewood cliffs: Prentice Hall, 1992. p. 170-208.

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

GOTTWALD, T. R. Citrus canker and citrus huanglongbing, two exotic bacterial diseases threatening the citrus industries of the Western Hemisphere. **Outlooks on Pest Management**, Grenville Court, v. 18, n. 6, p. 274, 2007.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. Citrus Canker: The pathogen and Its Impact. **Plant Health Progress**, Saint Paul, 2002. doi: <https://doi.org/10.1094/PHP-2002-0812-01-RV>

GOTTWALD, T. R.; MCGUIRE, R. G.; GARRAM, S. Asiatic citrus canker: spatial and temporal spread in simulated new planting situations in Argentina. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, p. 739-745, 1998.

GOTTWALD, T.R.; TIMMER, L.W.; MCGUIRE, R.G. Analysis of disease progress of citrus canker in nurseries in Argentina. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, p. 1276-1283, 1989.

GRAÇA, J. V.; KUNTA, M. K.; PARK, J. W.; GONZALEZ, M. Occurrence of a citrus canker strain with limited host specificity in south texas. **Plant Health Progress**, Saint Paul, v. 18, p. 196-201, 2017.

GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; CIVEROLO, E. L.; MCGUIRE, R. G. Population dynamics and survival of *Xanthomonas citri* subs. *citri* in soil in citrus nurseries in Maryland and Argentina. **Plant disease**, Saint Paul, v. 73, p.423-427, 1989.

GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. Variation in aggressiveness of *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo* associated with citrus bacterial spot in Florida citrus nurseries. **Phytopathology**, Beltsville, v. 80, p. 190–196, 1990.

GRAHAM, J.H.; MCGUIRE, R.G.; MILLER, J.W. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in citrus plant debris and soil in Florida and Argentina. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 71, p. 1094-1098, 1987.

HASSE, C. H. *Pseudomonas citri*, the cause of citrus canker. **Journal Agricola Research**, v. 4, p. 97-100, 1915.

HAUBEN, L.; VAUTERIN, L.; SWINGS, J.; MOORE, E. R. B. Comparison of 16S ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 47, p. 328–335, 1997.

HOLLAND, D. F. Generic index of the commoner forms of bacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 5, p. 191–229, 1920.

IBRAHIM, Y. E.; KOMY, M. H. E.; AMER, M. A.; WIDYAWAN, A.; AL-SALEH, M. A.; SALEH, A. A. Difficulties in identifying *Xanthomonas citri* subsp. *citri* A pathotypes. **Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 101, n. 4, p. 927-933, 2019.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. **SIDRA 2022**, sistema IBGE de recuperação automática. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e estatística, 2018. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613#resultado>. Acesso em 17 Jun. 2022.

INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 21, de 25 de abril de 2018. **DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO**, Brasília, 11 de maio de 2018, Seção 1, p. 9.

INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 37, de 5 de setembro de 2016. **DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO**, Brasília, 6 de setembro de 2016, Seção 1, p. 1.

INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 38, de 1° de outubro de 2018. **DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO**, Brasília, 2 de outubro de 2018, Seção 1, p. 14.

ISOKAR, S. S.; BRAMHANKAR, S.B.; DAS, A.K.; THAKUR, K.D.; PILLAI, T.; DINKWAR, G.T.; KHARAT, V. M. Morphological, biochemical and molecular characterization of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* isolates from different agroclimatic zones of Maharashtra. **International Journal of Chemical Studies**, Delhi, v. 8, n. 2, p. 62-70, 2020.

JANSSON, P.; KENNE, L.; LINDBERG, B. Structure of the extracellular polysaccharide from *xanthomonas campestris*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 45, n. 1, p. 275-282, 1975.

KALITA, P.; BORA, L.C.; BHAGABATI, K.N. Goat weed - a host of citrus canker (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*). **Journal of Mycology and Plant Pathology**, Udaipur, v. 27, p. 96-97, 1997.



- KOIZUMI, M. Citrus canker: The world situation. In: TIMMER, L.W. (Ed.) **Citrus canker: an international perspective**. Gainesville: University of Florida. Institute of Food and Agricultural Science, 1985. p. 2-7.
- LEE, Y. A.; HENDSON, M.; PANAPOULOS, 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 of Bacteriology**, Washington, v. 176, n. 1, p. 173-188, 1994.
- LEYNS, F.; DE CLEENE, M.; SWINGS, J.G.; LEY, J.D. The host range of the genus *Xanthomonas*. **The Botanical Review**, New York, v. 50, n. 3, p. 308-356, 1984.
- LIM, C.; COOKSEY, D. A. Characterization of chromosomal homologs of the plasmid borne copper resistance operon of *Pseudomonas syringae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 175, n. 14, p. 4492-4498, 1993.
- LOUWS, F. J.; FULBRIGHT, D. W.; STEPHENS, C. T.; BRUIJN, F. J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 60, n. 7, p. 2286-2295, 1994.
- LOUWS, F. J.; RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUIJN, F. J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual review of phytopathology**, Palo Alto, v. 37, n. 1, p. 81-125, 1999.
- MARIN, T.G.S.; GALVANIN, A.L.; LANZA, F.E.; BEHLAU, F. Description of copper tolerant *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and genotypic comparison with sensitive and resistant strains. **Plant Pathology**, Oxford, v. 68, n. 6, p. 1088-1098, 2019.
- MENKISSOGLU, O.; LINDOW, S.E. Chemical forms of copper on leaves in relation to the bactericidal activity of cupric hydroxide deposits on plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, n. 10, p. 1263-1270, 1991.
- MIRANDA, S. H. G.; BASSANEZI, R. B.; ADAMI, A. C. O. ABC das ações de defesa fitossanitária para o HLB em São Paulo: lições para a Citricultura do Nordeste. **Revista Bahia Agrícola**, Salvador, v.9, p.64-71, 2011.
- NAMEKATA, T.; OLIVEIRA, A. D. Comparative serological studies between *Xanthomonas citri* and a bacterium causing canker on Mexican lime. In: GEESTENANUS, H. P. M (Eds.). **Proceeding of the third Internacional conference on plant pathogenic Bacteria**. Wageningen: Editora the Netherlands, 1972. p. 151-152.
- NASER, S. M.; THOMPSON, F. L.; HOSTE, B.; GEVERS, D.; DAWYNDT, P.; VANCANNEY, N.; SWINGS, J. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. **Microbiology**, Reading, v. 151, n. 7, p. 2141-2150, 2005.
- NEVES, M. F.; TROMBIN, V.G. **Anuário da citricultura 2017**. 1.ed. São Paulo: CitrusBR, 2017.

NGOC, L. B. T.; VERNIÈRE, C.; JOUEN, E.; AH-YOU, N.; LEFEUVRE, P.; CHIROLEU, F.; GAGNEVIN, L.; PRUVOST, O. Amplified fragment length polymorphism and multilocus sequence analysis-based genotypic relatedness among pathogenic variants of *Xanthomonas citri* pv. *citri* and *Xanthomonas campestris* pv. *bilvae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 60, n. 3, p. 515-525, 2010.

OLIVEIRA, R. P.; FELICETTI, R. A.; JOÃO, P. L.; CARBONARI, J. J.; DANIELI, R. **Sistema integrado de medidas fitossanitárias para o manejo do cancro cítrico no Rio Grande do Sul**. Brasília: Embrapa Clima Temperado, 2017. p. 9-42.

PANTA, A.M.S.; SOBRINHO, V.R.A.S. Agronegócio da citricultura sergipana entre 2010 a 2017. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 40, p. 1-9, 2019.

PASSOS, O. S.; FILHO, M. A. C.; SOUZA, J. S.; LEÃO, H. C. **Produção de citros de mesa e industrial no Nordeste brasileiro** – avanços tecnológicos. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011. p. 1-4.

PORTARIA SDA N° 616, de 8 de julho de 2022. **DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO**, Brasília, 12 de julho de 2022, Seção 1, p. 9.

PRAKASH, O.; VERMA, M.; SHARMA, P.; KUMAR, M.; KUMARI, K.; SINGH, A.; KUMARI, H.; JIT, S.; GUPTA, S.K.; KHANNA, M.; LAL, R. Polyphasic approach of bacterial classification – Na overview of recente advances. **Indian Journal of Microbiology**, Delhi, v. 47, n. 2, p. 98-108, 2007.

PRUVOST, O.; MAGNE, M.; BOYER, K.; LEDUC, A.; TOURTEREL, C.; DREVET, C.; RAVIGNÉ, V.; GAGNEVIN, L.; GUERÍN, F.; CHIROLEU, F.; KOEBNIK, R.; VERDIER, V.; VERNIÈRE, C. A MLVA genotyping scheme for global surveillance of the citrus pathogen *Xanthomonas citri* pv. *citri* suggests a worldwide geographical expansion of a single genetic lineage. **PloS one**, San Francisco, v. 9, n. 6, p. e98129, 2014.

RADEMAKER, J. L. W.; HOSTE, B.; LOWUS, F. L. Comparison of AFLP and rep PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 50, n. 2, p. 665-677, 2000.

RADEMAKER, J. L. W.; LOUWS, F. J.; SCHULTZ, M. H.; ROSSBACH, U.; VAUTERIN, L.; BRUIJN, F. J. A. A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 95, n. 9, p. 1098-1111, 2005.

REZAEI, M. K.; SHAMS-BAKSH, M.; ALIZADEH, A. Genetic diversity among *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strains in iran. **Journal of Plant Protection Research**, Poznań, v. 52, n. 1, p. 1-9, 2012.

RICHARD, D.; BOYER, C.; VERNIÈRE, C.; CANTEROS, B.I.; LEFEUVRE, P.; PRUVOST, O. Complete genome sequences of six copper-resistant *Xanthomonas citri* pv. *citri* strains causing Asiatic citrus canker, obtained using long-read technology. **Genome Announcements**, Bloomington, v. 5, n. 12, p. e00010-17, 2017b.

RICHARD, D.; RAVIGNÉ, V.; RIEUX, A.; FACON, B.; BOYER, C.; BOYER, K.; GRYGIEL, P.; JAVEGNY, S.; TERVILLE, M.; CANTEROS, B.I.; ROBÈNE, I.; VERNIÈRE, C.; CHABIRAND, A.; PRUVOST, O.; LEFEUVRE, P. Adaptation of

genetically monomorphic bacteria: evolution of copper resistance through multiple horizontal gene transfers of complex and versatile mobile genetic elements. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 26, n. 7, p. 2131-2149, 2017a.

RODRIGUEZ-R, L. M.; GRAJALES, A.; ARRIETA-ORTIZ, M. L.; SALAZAR, C.; RESTREPO, S.; BEMAL, A; Genome-based phylogeny of the genus *Xanthomonas*. **BMC Microbiology**, London, v. 12, n. 43, p. 1-14, 2012.

RODRÍGUEZ, G.; GARZA, L.; STAPLETON, J.; CIVEROLO, E. Citrus bacteriosis in Mexico. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 69, n. 9, p. 808-810, 1985.

ROSSETTI, V. Citrus canker in Latin America: a review. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, v. 3, p. 918–924, 1977.

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

RYBAK, M.; MINSAVAGE, G.; STALL, R.; JONES, J. Identification of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* host specificity genes in a heterologous expression host. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 10, p. 249-262, 2009.

SANCHES, A. L. R.; MIRANDA, S. H. G.; JUNIOR, J. B.; BASSANEZ, R. B. Análise Econômica da Prevenção e Controle do Cancro Cítrico no Estado de São Paulo. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, Piracicaba, v. 52, n. 3, p. 549-566, 2014.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 3<sup>rd</sup> ed. St. Paul: APS Press, 2001. 373 p.

SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G. H.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P. E.; STROMBERG, V. K.; VIDAVER, A. K. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 29, n. 8, p. 690–695, 2006.

SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G. H.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P. E.; STROMBERG, V. K.; VIDAVER, A. K. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse) 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 *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**, Stuttgart, v. 28, n. 6, p. 494–518, 2005.

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**, Saint Paul, v. 85, p. 340-356, 2001.

SHIBATA, R. T.; REZENDE, J. O.; SOUZA, L. S. Citricultura nos estados da Bahia e Sergipe. **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 9, n. 3, p. 48-57, 2014.

SILVER, S.; PHUNG, L. T. Bacterial heavy metal resistance: New Surprises. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 50, p. 753-789, 1996.

STALL, R. E.; LOSCHKE, D. C.; JONES, J. B. Linkage of copper resistance and avirulence loci on a sel-transmissible plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 76, n. 2, p. 240-243, 1986.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G. M.; GRIMONT, P. A. D.; KAMPFER, J.; MAIDEN, M. C. J.; NESME, X.; ROSSELLÓ-MORA, R.; SWINGS, J.; TRUPER, G. G.; VAUTERIN, L.; WARD, A. C.; WHITMAN, W. B. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, Reading, v. 52, n. 3, p. 1043-1047, 2002.

SUN, X.; STALL, R.; JONES, J.; CUBERO, J.; GOTTWALD, T.; GRAHAM, J.; DIXON, W. N.; SCHUBERT, T. S.; CHALOUX, P. H.; STROMBERG, V.K.; LACY, G. H.; SUTTON, B. D. Detection and characterization of a new strain of citrus canker bacteria from key Mexican lime and Alemow in South Florida. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, p. 1179–1188, 2004.

SUNDIN, G. W.; JONES, A. L.; FULBRIGHT, D. W. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from cherry orchards and its associated transfer *in vitro* and in planta with a plasmid. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, n. 8, p. 861-865, 1989.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Foreign Agricultural Service. **Citrus: World Markets and Trade**. Disponível em: <https://www.fas.usda.gov/data/citrus-world-markets-and-trade>. Acesso em 30 jun. 2022

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological reviews**, Washington, v. 60, n. 2, p. 407-438, 1996.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 45, n. 3, p. 472–489, 1995.

VERNIERE, C.; HARTUNG, J.; PRUVOST, O.; CIVEROLO, E.; ALVAREZ, A.; MAESTRI, P.; LUISETTI, J. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 104, p. 477–487, 1998.

VERNIERE, C.; PRUVOST, O.; CIVEROLO, E. L.; GAMBIN, O.; JACQUEMOUD COLLET, J.P.; LUISETTI, J. Evaluation of the Biolog substrate utilization system to identify and assess metabolic variation among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 59, n. 1, p. 243-249, 1993.

VIDAL, M. F. **Citricultura na área de atuação do BNB**. editora: Caderno Setorial ETENE nº 41, 2018. 13 p.

VOLOUDAKIS, A. E.; BENDER, C. L.; COOKSEY, D. A. Similarity between copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* and *Pseudomonas syringae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 5, p. 1627-1634, 1993.

VOLOUDAKIS, A. E.; REIGNIER T.M.; COOKSEY D.A. Regulation of resistance to copper in *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 2, p. 782-789, 2005.

YOUNG, J. M.; BRADBURY, J. F.; PANAGOPOULOS, C. G.; ROBBS, C. F. A proposed nomenclature and classification for pathogenic bacteria. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 21, n. 1, p. 153-177, 1978.

YOUNG, J. M.; PARK, D. C.; SHEARMAN, H. M.; FARGIER, E. A. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 31, n. 5, p. 366-377, 2008.

## Capítulo II

---

---

# **First Report of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* causing Citrus Canker on lime in Rio Grande do Norte, Brazil**

Publicação: **Plant Disease**  
**Vol. 105, No. 12, 2021**  
Disease NoteJCR = 4.438

1 **First Report of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* causing Citrus Canker on lime in Rio**  
2 **Grande do Norte, Brazil**

3  
4 **L.C.S. Amancio, A.D.B. Baia**, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de  
5 Agronomia, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brazil, **E.B. Souza**, Universidade Federal Rural  
6 de Pernambuco, Departamento de Biologia, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brazil, **R.S.**  
7 **Júnior**, Universidade Federal Rural do Semiárido, Departamento de Ciências Vegetais,  
8 Mossoró, 59625-900, Rio Grande do Norte, Brasil, **V.Q. Balbino**, Universidade Federal de  
9 Pernambuco, Departamento de Genética, Recife, 50740-600, Pernambuco, Brazil and **M.A.S.**  
10 **Gama**, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife,  
11 52171-900, Pernambuco, Brazil.

12  
13 Funding: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico 305843/2016-8.  
14 Plant Dis. 105:4148, 2021; published online as [https:// doi.org/10.1094/PDIS-11-20-2498-](https://doi.org/10.1094/PDIS-11-20-2498-PDN)  
15 PDN. Accepted for publication 16 June 2021.

16  
17 Citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* is one of the most important citrus  
18 diseases in the world (Gottwald et al. 2002), mainly for citrus-producing countries with humid  
19 subtropical regions such as United States, Argentina, and Brazil, where losses may be  
20 significant (Behlau et al. 2020). In the state of Rio Grande do Norte (RN), Brazil, citrus  
21 production is expanding and shows social and economic importance for small farmers, which  
22 produced approximately 297 tons of lime in this state in 2019 (IBGE 2021). In December 2019,  
23 we observed symptoms of erumpent lesions with margins surrounded by yellow haloes on  
24 leaves and fruit of the lime (*Citrus aurantifolia* cv. Galego) (about 5% incidence) in a plantation  
25 located in the municipality of Mossoró, RN (05° 12' 21.1'' S, 37° 19' 16'' W). Samples were  
26 collected from the lime orchard, and five bacterial strains (CCRMXC01 to CCRMXC05)  
27 showing yellow, convex, mucoid colonies were isolated in a nutrient-yeast-dextrose-agar  
28 medium (NYDA). Pathogenicity tests were performed on sweet orange (*C. sinensis* cv. Pêra)  
29 and lime (*C. latifolia* cv. Tahiti) seedlings. Four wounds per leaf (upper side) were carried out  
30 with an entomological pin and 10 µl of a bacterial suspension (10<sup>8</sup> CFU ml<sup>-1</sup>) were deposited  
31 on each wound. The negative control consisted of leaves treated with sterile distilled water  
32 (SDW). For each citrus species, we used four replicates per strain and one leaf with four wounds  
33 per replicate. Inoculated leaves developed erumpent lesions with margins surrounded by yellow  
34 haloes six days after inoculation (DAI) in both citrus species, while leaves treated with SDW  
35 remained symptomless. Nine DAI, we reisolated the pathogen and performed rep-PCR (REP,  
36 ERIC, and BOX-PCR) analyses (Gama et al. 2018) with the strains inoculated and reisolated  
37 to confirm the identity of the strains and to fulfill Koch's postulates. The strains were stored at  
38 the Culture Collection Rosa Mariano (CCRM) of the Phytobacteriology Laboratory at the  
39 Universidade Federal Rural de Pernambuco. The five strains reisolated showed the same REP,

40 ERIC, and BOX-PCR profiles as the strains used for inoculations. The molecular identification  
41 was performed sequencing the *dnaK*, *fyuA*, *gyrB*, and *rpoD* genes (Young et al. 2008). Each  
42 fragment was sequenced in both the forward and reverse directions. Using the BLASTn tool,  
43 we observed that sequences of the *dnaK* (GenBank MW218913 to MW218917), *fyuA*  
44 (MW218918 to MW218922), and *rpoD* (MW218928 to MW218932) genes of the strains  
45 CCRMXC01 to CCRMXC05 showed 100% identity with the sequences of these genes from  
46 the type strain (ICMP 24T) and of other strains of *X. citri* subsp. *citri* (ICMP 21 and ICMP  
47 7493), while sequences of *gyrB* (MW218923 to MW218927) of the former strains showed  
48 100% identity with the *gyrB* sequence of the strains ICMP 24T and ICMP 7493 and 99.85%  
49 identity with strain ICMP 21. This short variation in the sequence of the *gyrB* gene also may  
50 be observed among strains of *X. citri* subsp. *citri* available in NCBI  
51 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The phylogenetic analysis performed using Bayesian  
52 inference and the concatenated sequence of all the type or representative strains of species and  
53 pathovars of *Xanthomonas* available in GenBank showed that the strains CCRMXC01 to  
54 CCRMXC05 clustered together with strain ICMP 24T with 1.0 posterior probability. To our  
55 information, this is the first report of *X. citri* subsp. *citri* causing citrus canker on lime in RN  
56 state, Brazil.

57

## 58 **References**

- 59 Behlau, F., et al. 2020. Trop. Plant Pathol. 45:200.  
60 Gama, M. A. S., et al. 2018. Phytopathology 108:1143.  
61 Gottwald, T. R., et al. 2002. Plant Health Prog. 3.  
62 IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2021. SIDRA. Rio Janeiro.  
63 <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613#resultado>.  
64 Young, J. M., et al. 2008. Syst. Appl. Microbiol. 31:366.

65

66 The author(s) declare no conflict of interest.

67

68 Keywords: prokaryotes, tree fruits, pathogen detection, disease warning systems

69

70

71

72

73

74

75

76

77

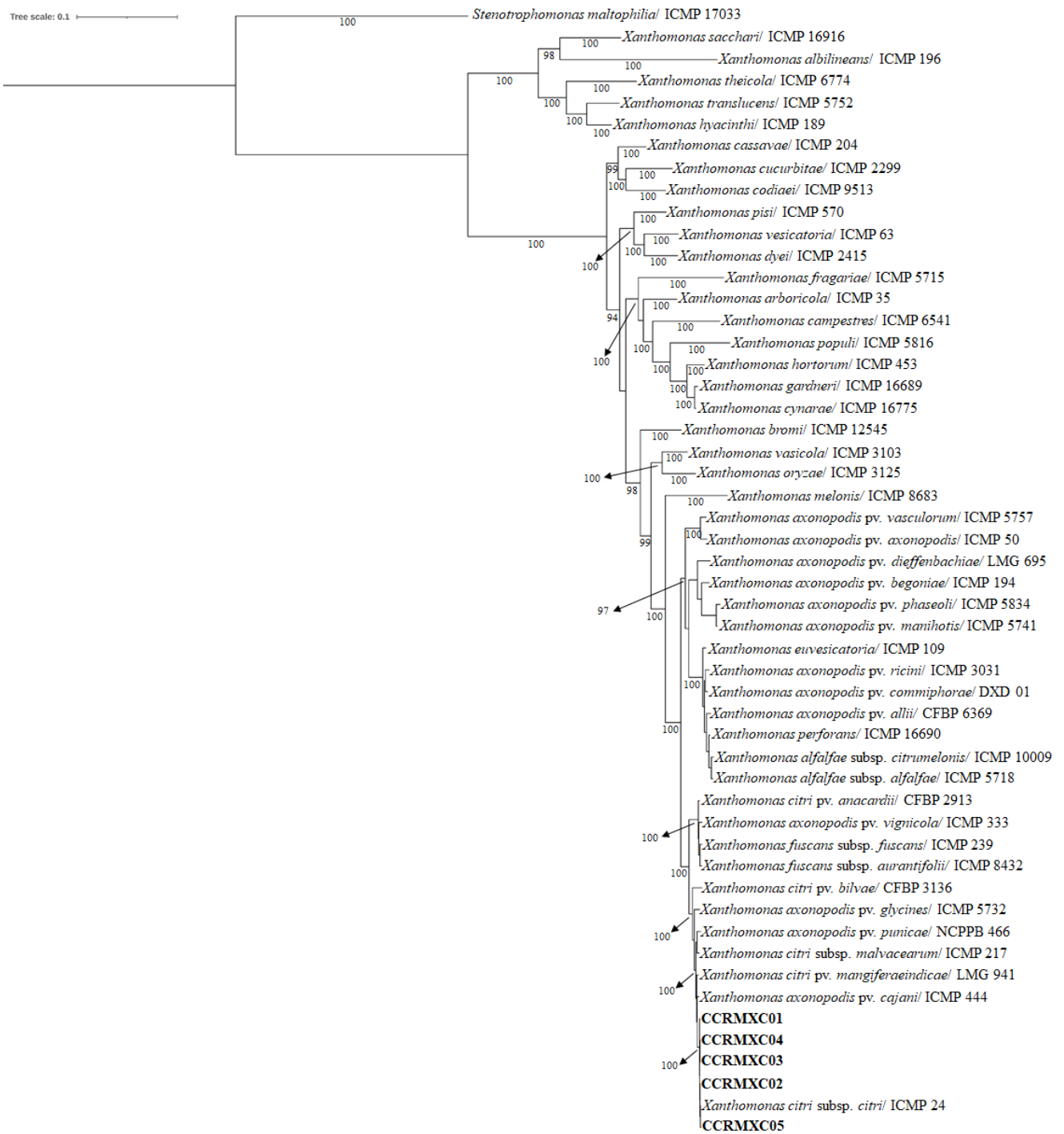
78

79

80



81



82

83

84

85 Supplementary Figure S1: Phylogenetic analysis performed by Bayesian inference from the  
 86 partial sequence of the *dnaK*, *fyuA*, *gyrB*, and *rpoD* genes showing the strains CCRMXC01  
 87 to CCRMXC05 grouped along with the type strain of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (ICMP  
 88 24T). Posterior probability values >0.90 are shown on the branches.

89

## Capítulo III

---

---

### **Polyphasic characterization of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strains associated with citrus canker in Northeast Brazil**

1 **Polyphasic characterization of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strains associated with citrus**  
2 **canker in Northeast Brazil**

3

4 **Lucas C. S. Amancio<sup>1</sup>; Adriano M. F. Silva<sup>1</sup>; Rui S. Júnior<sup>2</sup>; Valdir Q. Balbino<sup>3</sup>; \*Marco**  
5 **A. S. Gama<sup>1</sup>; Wallison O. Vieira<sup>4</sup>; Lucas P. De Lucena<sup>1</sup>; Elineide B. Souza<sup>5</sup>**

6

7 <sup>1</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

8 <sup>2</sup>Departamento de Ciências Vegetais, Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, RN,  
9 Brazil

10 <sup>3</sup>Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

11 <sup>4</sup>Departamento técnico, Biomulti, Janaúba, MG, Brazil

12 <sup>5</sup>Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

13

14 \*Correspondence: Marco A. S. Gama, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Ru-  
15 ral de Pernambuco, Recife, CEP 51030-230, PE, Brazil

16 Email: [marco.gama@ufrpe.br](mailto:marco.gama@ufrpe.br)

17

18 **KEYWORDS**

19 rep-PCR, multilocus sequence analysis, biochemical analysis

20

21 **Abstract**

22

23 Citrus canker, caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, is one of the main citrus diseases and  
24 has been reported in several states of Brazil. However, few studies have been undertaken on the  
25 characteristics of the strains associated with this disease in Northeast Brazil. Thus, we  
26 performed a polyphasic analysis using rep-PCR assay, multilocus sequence analysis (MLSA),  
27 biochemical analysis, and pathogenicity test to characterize 143 strains of *X. citri* subsp. *citri*  
28 associated with citrus canker in Northeast Brazil, which were obtained in the states of Ceará  
29 (CE), Rio Grande do Norte (RN), and Piauí (PI). The unweighted pair group method (UPGMA)  
30 analysis performed with the combined data from the profiles generated with the REP, ERIC,  
31 and BOX-PCR resulted in the detection of a single haplotype, with all strains considered clones.  
32 Phylogenetic analysis using Bayesian inference (BI) with the *dnaK*, *fyuA*, *gyrB*, and *rpoD* genes  
33 showed that two representative strains of the CE, RN, and PI (CCRMXC09, CCRMXC15,  
34 CCRMXC35, CCRMXC69, CCRMXC122, and CCRMXC130) clustered together with type

35 strain of *X. citri* subsp. *citri* (ICMP 24<sup>T</sup>). Pathogenicity test performed on sweet orange (*Citrus*  
36 *sinensis*), lime (*Citrus latifolia*), and grapefruit (*Citrus paradisi*) showed that all strains caused  
37 typical citrus canker symptoms, showing a predominance of *X. citri* subsp. *citri* pathotype A.  
38 Our data confirm the presence of citrus canker in CE, RN, and PI states and show a genetic  
39 homogeneity among the strains present in the Northeast region.

40

## 41 **1 INTRODUCTION**

42

43 Citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Hasse) is one of the most  
44 important diseases affecting citrus in Brazil and worldwide (Gottwald et al., 2002; Behlau  
45 2021). This bacterium cause symptoms on leaves, branches, and fruits, reduces productivity  
46 due to the premature drop of affected fruits, and restricts production marketing to other regions  
47 without their presence (Gottwald et al., 2002). The first report of *X. citri* subsp. *citri* in Brazil  
48 occurred in 1957 (Bitancourt, 1957). Currently, it is considered a quarantine pest, officially  
49 detected in states of Southeast (Minas Gerais and São Paulo), Center-West (Mato Grosso do  
50 Sul and Mato Grosso), North (Roraima), South (Paraná, Rio Grande do Sul, and Santa Catarina)  
51 and Northeast regions (Maranhão, Ceará, and Piauí) from Brazil (Regulatory Instruction  
52 38/2018) (MAPA, 2018). In addition, it has recently been reported in another state of Northeast  
53 region (Rio Grande do Norte) on lime (Amancio et al., 2021).

54 The movement of contaminated plant materials, mainly through human activities, is the  
55 main cause of the long-distance spread of bacterial citrus canker (Gottwald et al., 2002).  
56 Furthermore, it is evident that citrus canker was introduced into different countries and  
57 especially in Brazil via contaminated citrus propagating material (Bitancourt, 1957; Das, 2003;  
58 Graham et al., 2004). In Brazil, soon after the identification of citrus canker in Southeast region  
59 in the late 1950s, the disease was also tracked in other regions. In the northeast of Brazil, the  
60 introduction of the disease occurred in the last decade, reported initially in the state of Ceará  
61 (CE) in December 2011 (Behlau et al., 2020a). Later, the disease was also officially identified  
62 in the states of Maranhão (MA) and Piauí (PI) (Regulatory Instruction 38/2018) (MAPA, 2018),  
63 and in 2021 in the state of Rio Grande do Norte (RN) (Amancio et al., 2021).

64 Based on the host range and the characteristic symptoms, *X. citri* subsp. *citri* has been  
65 classified in three main pathotypes (Venière et al., 1998; Sun et al., 2004; Behlau et al., 2020b),  
66 namely: *X. citri* subsp. *citri* pathotype A (Xcc-A), pathotype A\* (Xcc-A\*), and pathotype A<sup>w</sup>  
67 (Xcc-A<sup>w</sup>). Strains of pathotype Xcc-A cause canker in all citrus species, while strains of Xcc-  
68 A\* produce typical erumpent bacterial canker lesions on Mexican lime (*Citrus aurantifolia* L.),

69 lime (*Citrus latifolia* L.), and sweet orange (*Citrus sinensis* L.), but not on grapefruit (*Citrus*  
70 *paradisi* L.) (Venière et al., 1998). On the other hand, strains of Xcc-A<sup>W</sup> differ from the Xcc-  
71 A\* strains in their ability to cause a hypersensitive response (HR) on grapefruit and sweet  
72 orange (Sun et al., 2004). In addition, *X citri* pv. *aurantifolii* (Schaad) pathotype B and C (Xca-  
73 B and Xca-B), and *X. alfalga* subsp. *citrumelonis* (Schaad et al.) pathotype E (Xac-E) also have  
74 been associated with citrus canker symptoms (Behlau et al., 2020b).

75 Polyphasic approaches integrating biochemical, molecular, and pathological  
76 characteristics have been used to assess genetic diversity and variability within and among  
77 bacterial populations of several *Xanthomonas* species and pathovars (Cubero and Graham 2002;  
78 Picard et al., 2008; Ah-You et al., 2009; Baia et al., 2021). Among the technics used in these  
79 studies, rep-PCR assay has been used to assess the genetic diversity of *Xanthomonas* spp.  
80 (Lopes et al., 2001; Munhoz et al., 2011; Arshadi et al., 2013; Arshiya et al., 2014), and to  
81 distinguish Xcc-A strains from different geographic areas (Cubero and Graham 2002). In turn,  
82 multilocus sequence analysis (MLSA) with the *dnaK*, *fyuA*, *gyrB*, and *rpoD* genes has shown a  
83 high discriminatory power for the differentiation of *Xanthomonas* spp. (Young et al., 2008;  
84 Ferraz et al., 2019) and it has been a useful tool to discriminate different pathovars of *X. citri*  
85 (Ferreira et al., 2019), and other pathovars of *Xanthomonas* (Fargier et al., 2007; Fargier et al.,  
86 2011; Ferraz et al., 2019).

87 Therefore, given that there is little information about the characteristics of *X. citri* subsp.  
88 *citri* strains associated with citrus canker in Northeast of Brazil, this study aimed to carry out a  
89 polyphasic characterization using biochemical, rep-PCR, MLSA, and pathological analyses to  
90 assess *X. citri* subsp. *citri* strains obtained from different states of Northeast Brazil from 2019  
91 to 2021. In this study, we observed a genetically homogeneous population, which indicates a  
92 recent introduction of citrus canker in Northeast Brazil. In addition, the results obtained in this  
93 study on the biochemical, molecular, and pathological characteristics of *X. citri* subsp. *citri*  
94 strains found in Northeast Brazil will be used to assess strategies for managing citrus canker in  
95 this region.

96

## 97 **2 MATERIALS AND METHODS**

98

### 99 **2.1 Pathogen isolation and pathogenicity test**

100

101 Leaves and fruit from Mexican lime (cv. ‘Galego’) and sweet oranges (cv. ‘Pêra’), presenting  
102 typical symptoms of citrus canker were collected from orchards in the states of RN, CE, and

103 PI, Northeast Brazil. We performed pathogen isolations on NYDA media (20 g/liter agar, 10  
104 g/liter dextrose, 5 g/liter peptone, 5 g/liter yeast extract, and 3 g/liter meat extract in H<sub>2</sub>O) and  
105 pathogenicity tests on sweet orange (cv. 'Pêra') according to protocols previously established  
106 by Venière et al. (1998).

107 Bacterial suspensions (10<sup>5</sup> CFU/ mL) were inoculated into plants by infiltration on the  
108 abaxial surface of the leaf. The inoculation was performed at six points of the abaxial surface  
109 by infiltration of 100 µl of the suspensions with the aid of a needleless hypodermic syringe.  
110 Leaves inoculated with sterile distilled water (SDW) were used as a negative control. The  
111 experiment was completely randomized with four replicates such that each replicate comprised  
112 one inoculated leaf with six points of inoculation. The pathogen was reisolated from lesions  
113 characteristic of citrus canker 10 days after inoculation, thus completing Koch's Postulates. The  
114 strains obtained were preserved in SDW and lyophilization and subsequently stored at the  
115 Culture Collection Rosa Mariano (CCRM) of the Phytobacteriology Laboratory at the  
116 Universidade Federal Rural de Pernambuco.

117

## 118 **2.2 DNA Extraction and rep-PCR discriminating**

119

120 DNA extraction from the strains obtained in this study together with five other strains  
121 previously identified as *X. citri* subsp. *citri* by Amancio et al. (2021) listed in Table S1 was  
122 performed according to Gama et al. (2018) and quantified as previously described by Gama et  
123 al. (2011). The repetitive element palindromic (REP), enterobacterial repetitive intergenic  
124 consensus (ERIC), and BOX element (BOX)-polymerase chain reaction (PCR) analyses were  
125 performed according to Louws et al. (1994), with some modifications: 1× PCR Master Mix 2×  
126 (0.05 U/µl of Taq DNA polymerase, reaction buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4mM of each dNTP), 2  
127 µM of each primer, and 200 ng of DNA. The samples were amplified in a thermocycler, model  
128 PTC-100 (MJResearch,MA). Negative controls (DNA-free reactions) were included in all of  
129 the experiments to test for the presence of contaminants. Twelve microliters of each  
130 amplification reaction were mixed with 3 µl of loading buffer and 3 µl of Safe SYBER, applying  
131 a total volume of 18 µl in each well of the gel. The amplified fragments were visualized using  
132 a 1.5% agarose gel. The electrophoretic was performed for 3h at 80 V in 0.5× Trisborate-  
133 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (TBE) buffer using GenRuler 1 kb DNA Ladder  
134 (Fermentas Life Sciences) markers. The gel was photographed. The analyses were performed  
135 two times.

136 The amplification profiles generated with the REP-, ERIC-, and BOX-PCR primers  
137 were visually analyzed according to the presence (1) or absence (0) of 100- to 3,000-bp bands,  
138 and only reproducible bands were recorded. The data generated with each primer were analyzed  
139 separately and together using the multivariate statistical package v. 3.22 (Pavlicek et al., 1999).  
140 Only the reproducible bands ranging from 100 bp to 3 kb were scored for each strain. The  
141 Jaccard similarity coefficient was used to determine the genetic relationships between the  
142 isolates. A distance tree was constructed using the unweighted pair group method with the  
143 arithmetic mean (UPGMA) method.

144

### 145 **2.3 Multilocus sequence analysis (MLSA)**

146

147 Two strains representative of each state of the Northeast Brazil listed in Table S1 characterized  
148 by a rep-PCR were used for MLSA. These strains were selected based on the variability  
149 observed in the rep-PCR analysis. The amplification of fragments of the gene *gyrB* (DNA  
150 gyrase beta subunit), *rpoD* (RNA polymerase sigma subunit), *fyuA* (tonB dependent receptor),  
151 and *dnaK* (chaperone protein dnaK) from strains CCRMXC09, CCRMXC15, CCRMXC35,  
152 CCRMXC69, CCRMXC122, and CCRMXC130 was performed as described by Young et al.  
153 (2008). PCR amplifications were performed with an initial denaturation at 94°C for 3min, 30  
154 cycles of denaturation at 94°C for 30s, annealing at 54°C for 30s, extension at 72 °C for 1 min,  
155 and final extension at 72°C for 10 min. The amplified fragments were visualized by 1% agarose  
156 gel, and an electrophoretic run performed for 1.5 h at 80V in 0.5× TBE buffer using the  
157 GenRuler 1-KB DNA Ladder marker. The PCR products were purified using a Clean-up kit  
158 (Axygen Biosciences), and each fragment was sequenced in both the forward and reverse  
159 directions.

160 The nucleotide sequences were aligned using Muscle (Edgar, 2004), available in  
161 Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) v. 11 (Tamura et al., 2021), and manually  
162 adjusted to allow for maximum similarity of the sequences. The ends of the sequences were  
163 trimmed, resulting in 724, 758, 585, and 852 nucleotide sequences for *gyrB*, *rpoD*, *fyuA*, and  
164 *dnaK*, respectively.

165 The sequences obtained from the *dnaK*, *fyuA*, *gyrB*, and *rpoD* genes were compared  
166 with the sequences of these genes from the types strain ICMP 24<sup>T</sup> and other strains (ICMP  
167 7493 and ICMP 21) of *X. citri* subsp. *citri* available in the GenBank database  
168 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), using the software BLASTn

169 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). All sequences obtained in this study were deposited  
170 in GenBank

171 Phylogenetic tree was constructed with sequences of the four housekeeping genes  
172 obtained in this work, those reported by Young et al. (2008) for *Xanthomonas* spp., and  
173 representative strains of species and pathovars of *Xanthomonas* available in GenBank  
174 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Bayesian Inference (BI) methods were used to construct  
175 phylogenetic tree of concatenated *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* and *rpoD* gene sequences. Mr. ModelTest  
176 3.2 was used to choose the substitution model based on the Akaike information criterion (AIC).  
177 The probability of a posteriori tree distribution was calculated using an MCMC algorithm  
178 (Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo) of two chains from a random tree with 10  
179 million generations, discarding 25% of the first trees. The Tracer 1.4 program was used to  
180 examine the MCMC convergence and effective sample size. FigTree 1.3.1.  
181 (<http://tree.bio.ac.uk/software>) was used to view and edit the phylogenetic tree.

182

## 183 **2.4 Biochemical characterization of bacterial strains**

184

185 Six strains selected based on rep-PCR assay and used in MLSA analysis were biochemically  
186 characterized using the Biolog® GEN III system, which contains 71 carbon sources and 23  
187 inhibitory substances. The bacterial suspension was prepared in IF-A inoculation fluid from  
188 bacterial growth obtained by cultivating the strains in Biolog Universal growth (BUG®)  
189 medium, at 30°C, for 48 hours. The suspensions were adjusted to 98% transmittance and then  
190 100 µl were deposited in each well of the microplates. Subsequently, the microplates were  
191 incubated at 33°C for 36 h. The evaluation observed the presence of bacterial growth, evidenced  
192 by the purple color indicating the reduction of triphenyl tetrazolium chloride.

193

## 194 **2.5 Pathological characterization**

195

196 All 143 strains listed in Table S1 were tested for pathogenicity on leaves of sweet orange (cv.  
197 ‘Pera’), lime (cv. ‘Tahiti’), and grapefruit (cv. ‘Marsh’). The strains were inoculated by infil-  
198 tration of bacterial suspensions containing  $1 \times 10^5$  CFU/ mL on the abaxial leaf surface with the  
199 aid of a needleless hypodermic syringe, as described previously by Venière et al. (1998). The  
200 negative control consisted of leaves treated with SDW. The experiment was completely ran-  
201 domized with four replicates such that each replicate comprised one leaf with six inoculation



202 points per strain. Symptom development was observed 6, 9, and 18 days after inoculation (dai).  
203 Plants were maintained in the greenhouse at 28-32°C.

204

## 205 **3 RESULTS**

206

### 207 **3.1 Pathogen isolation**

208

209 We isolated 137 bacterial strains from the leaves and fruit of Mexican lime (132 strains) and  
210 sweet orange (5 strains) with symptoms characteristic of citrus canker. All the strains inoculated  
211 on leaves of sweet orange were pathogenic and caused symptoms of erumpent lesions with  
212 margins surrounded by chlorotic halos, a set of characteristic symptoms caused by *X. citri*  
213 subsp. *citri*. Leaves treated with SDW remained symptomless.

214

### 215 **3.2 Rep-PCR discriminating**

216

217 The genomic DNA of the remaining 143 strains (listed in Table S1) was analyzed by a rep-PCR  
218 approach, generating 34 reproducible bands ranging from 100 to 3,000 bp approximately. The  
219 number of scored bands generated from the 143 strains using REP, BOX, and ERIC were 14,  
220 11, and 10, respectively, with multiple and reproducible bands of different intensities. The  
221 UPGMA analysis performed with the combined data from the profiles generated with the REP,  
222 ERIC, and BOX markers, resulted in the demarcation of a single group at the level of 100%  
223 similarity, with all strains considered clones (Figure 1).

224

### 225 **3.3 Multilocus sequence analysis (MLSA)**

226

227 Using the BLASTn tool, we observed that sequences of the *dnaK*, *fyuA*, and *rpoD* genes (Table  
228 S2) of the strains CCRMXC09, CCRMXC15, CCRMXC35, CCRMXC69, CCRMXC122, and  
229 CCRMXC130, selected based on rep-PCR, showed 100% identity with the sequences of these  
230 genes from the type strain (ICMP 24<sup>T</sup>) and other strains of *X. citri* subsp. *citri* (ICMP 7493 and  
231 ICMP 21), while sequences of *gyrB* of the former strains showed 100% identity with  
232 the *gyrB* sequence of the strains ICMP 24<sup>T</sup> and ICMP 7493 and 99.86% identity with strain  
233 ICMP 21 (Table S3). This short variation in the sequence of the *gyrB* gene also may be observed  
234 among strains of *X. citri* subsp. *citri* available in NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

235 The phylogenetic BI trees constructed with the concatenated sequences of the  
 236 representative strains of species and pathovars of *Xanthomonas* available in GenBank (Table  
 237 S4) and sequences of the *dnaK*, *fyuA*, *gyrB*, and *rpoD* genes listed in Table S2 of the six strains  
 238 representative from state of origin (Northeast of Brazil), selected based on rep-PCR, clustered  
 239 the strains CCRMXC09, CCRMXC15, CCRMXC35, CCRMXC69, CCRMXC122, and  
 240 CCRMXC130 along with the type strain of *X. citri* subsp. *citri* (ICMP 24<sup>T</sup>) with 1.0 posterior  
 241 probability (Figure 2).

242

### 243 **3.4 Biochemical analyses**

244

245 Metabolic fingerprinting showed that the six strains used in this study used the same carbon  
 246 sources and were sensitive to the same inhibitory substances. All strains showed positive  
 247 reactions for 47 % of the chemical present in the Biolog plate. The positive reactions occurred  
 248 for dextrin, D-maltose, D-trehalose, D-Cellobiose, gentiobiose, sucrose, D-turanose,  
 249 stachyose, PH 6, D-melibiose, N-acetyl-D-glucosamine, N-acetyl- $\beta$ -D-mannosamine, 1%  
 250 NaCl,  $\alpha$ -D-glucose, D-mannose, D-fructose, D-galactose, L-fucose, 1% sodium lactate,  
 251 glycerol, rifamycin SV, gelatina, glycyl-L-proline, L-alanine, L-aspartic acid, L-glutamic acid,  
 252 L-serine, lincomycin, pectin, D-galacturonic acid, D-glucuronic acid, glucoronamide, mucic  
 253 acid, tetrazolium blue, methyl pyruvate, citric acid,  $\alpha$ -Keto-glutaric acid, D-malic acid, bromo-  
 254 succinic, tween 40,  $\alpha$ -Keto-butyric acid, acetoacetic acid, propionic acid, acetic acid, and formic  
 255 acid. All strains showed negative reactions for 53% of the chemical presente in the Biolog plate.  
 256 The negative reactions occurred for D-turanose, stachyose, PH 5, D-raffinose,  $\alpha$ -D-lactose,  $\beta$ -  
 257 methyl-D-glucoside, D-salicin, N-acetyl-D-galactosamine, N-cetyl neuraminic acid, 4% NaCl,  
 258 8% NaCl, 3-methyl glucose, D-fucose, L-rhamnose, lisosine, fusidic acid, D-serine, D-sorbitol,  
 259 myo-inositol, D-glucose-6-PD4, D-fructose-6-PD4, D-aspartic acid, D-serine, troleandomycin,  
 260 minocycline, L-arginine, L-histidine, L-pyroglutamic acid, guanidine HCl, niaproof 4, L-  
 261 galactonic acid lactone, D-gluconic acid, quinic acid, D-saccharic acid, vancomycin,  
 262 tetrazolium violet, p-hydroxy-phenylacetic acid, D-lactic acid methyl ester, L-lactic acid,  
 263 nalidixic acid, lithium chloride, potassium tellurite,  $\gamma$ -Amino-Butyric acid,  $\alpha$ -hydroxy-butyric  
 264 acid,  $\beta$ -hydroxy-D, L-butyric acid, aztreonam, sodium butyrate, and sodium bromat (Table S5).

265

### 266 **3.5 Pathological characterization**

267

268 All strains obtained from Northeast Brazil were pathogenic when inoculated by infiltration  
269 sweet orange, lime, and grapefruit. The first symptoms of the disease were observed 4-6 dai on  
270 sweet-orange, lime and grapefruit. Initially, water-soaking regions were observed, and with the  
271 progress of the disease, they became erumpent with margins surrounded by yellow haloes, more  
272 clearly seen 9 to 18 dai (Figure 3). Leaves treated with SDW remained symptomless. There was  
273 no difference observed in symptomatology between the strains. No HR was observed during  
274 this test. Our results showed that all strains belong to pathotype A of *X. citri* subsp. *citri*.

275

#### 276 **4 DISCUSSION**

277

278 A total of 137 strains showing yellow, convex, mucoid colonies were isolated from the  
279 citrus (*C. latifolia* and *C. sinensis*) growing of RN, CE, and PI states, Northeast Brazil, during  
280 2019-2021. These strains were pathogenic when inoculated on sweet orange and produced  
281 symptoms typical of citrus canker. The genetic variability of these strains was analyzed using  
282 the rep-PCR (REP, BOX and ERIC) technique. We observed the same rep-PCR profile for all  
283 strains, regardless the origin of the strain. Naturally, UPGMA analysis grouped all strains in a  
284 single group at the level of 100% similarity. Thus, these results demonstrate the presence of a  
285 clonal population in citrus-producing areas of these states. These results contrast with those  
286 obtained by Arshadi et al. (2013) and Ibrahim et al. (2019), who showed relatively high genetic  
287 diversity among strains of *X. citri* pv. *citri* from the West Malaysia and Saudi Arabia, based on  
288 the data of BOX and ERIC-PCR, and REP, ERIC, and BOX-PCR fingerprints, respectively.  
289 Based on the information above, our results suggest a recent and uniform introduction of citrus  
290 canker in the Northeast region.

291 Rep-PCR assays revealed a clonal population, so two representative strains from the  
292 state of CE (CCRMXC09 and CCRMXC15), RN (CCRMXC35 and CCRMXC69), and PI  
293 (CCRMXC122 and CCRMXC130) were used for MLSA analysis. Thus, the combination of  
294 these techniques allowed the identification of all strains obtained in this study as *X. citri* subsp.  
295 *citri*. According to Young et al. (2008), the MLSA technique using concatenated partial  
296 sequences of the *gyrB*, *rpoD*, *fyuA*, and *dnaK* genes is a robust tool for discrimination species  
297 of *Xanthomonas* spp. In the present study, the partial sequences of these genes allowed the  
298 precise allocation of the six strains obtained from citrus with citrus canker in the states of RN,  
299 CE and PI in the taxonomic group of *X. citri* subsp. *citri*, indicating that they all belong to the  
300 same subspecies of *X. citri*. The biochemical analyses revealed high biochemical similarity  
301 among the strains CCRMXC09, CCRMXC15, CCRMXC35, CCRMXC69, CCRMXC122, and

302 CCRMXC130. This high similarity has also been observed in the strains of *X. citri* subsp. *citri*  
303 from West Malaysia, which exhibits low plasticity and genetic diversity, resulting in similar  
304 biochemical profiles (Arshiya et al., 2014).

305         Based on the information above, our results suggest the existence of a homogeneous  
306 population and a recent introduction of citrus canker in the Northeast Brazil. In this region, the  
307 citrus canker was first reported in CE in December 2011 (Behlau, 2020), while in the PI, and  
308 MA states the detection of this disease had a recent occurrence (Regulatory Instruction 38/2018)  
309 (MAPA,2018), and recently reported by Amancio et al. (2021) in RN state. The Bahia (BA),  
310 Sergipe (SE), Pernambuco (PE), and Paraíba (PB) states were recognized as areas with no  
311 occurrence of citrus (MAPA, 2017a, 2017b,2017c, 2017d), while Alagoas (AL) it is under an  
312 unknown status regarding the occurrence of citrus canker (Behlau, 2020). We believe that citrus  
313 growers' lack of knowledge about exclusion measures, together with the easy circulation of  
314 seedlings, have contributed to the rapid spread of the disease in the Northeast region in recent  
315 years.

316         The pathological characterization of the 143 strains listed in Table S1 showed that all  
317 were able to cause typical symptoms of citrus canker on sweet-orange, lime, and grapefruit,  
318 showing that all strains belong to pathotype A and indicating absence of Xcc-A\* and Xcc-A<sup>W</sup>.  
319 Using differential citrus cultivars, Venière et al. (1998) and Sun et al. (2004) classified *X. citri*  
320 subsp. *citri* in different pathotype. The strains of Xcc-A\* have a host range restricted to  
321 Mexican lime, lime, and alemow (*Citrus macrophylla* Wester), but not infecting the susceptible  
322 species grapefruit. On the other hand, Xcc-A<sup>W</sup> differ from the Xcc-A\* strains in their ability to  
323 cause a HR on grapefruit and sweet orange. Ibrahim et al. (2019) reported that strains of Xcc-  
324 A from Sauditi Arabia caused typical symptoms of citrus canker on grapefruit and Mexican  
325 lime. However, a second group failed to incite any erumpent lesions on grapefruit, but they  
326 induced lesions on Mexican lime, classifying theses strains as Xcc-A\*. Similarly, Lee et al.  
327 (2008) observed that strains from Korea produced typical canker symptoms on sweet-orange,  
328 grapefruit, lemon, and Mexican lime, relating these strains to Xcc-A.

329         Finally, our research confirms the occurrence of citrus canker caused by *X. citri* subsp.  
330 *citri* in CE, RN and PI states, and showed a homogeneity among the strains present in this  
331 region. In the current scenario, there is growing concern about the expansion of citrus canker  
332 in the Northeast region, given the recent emergence of disease in the state RN (Amancio et al.,  
333 2021). In Brazil, the second largest citrus belt is located in northern BA and southern SE (Neves  
334 and Trombin, 2017), and its neighboring states may be responsible for disseminating *X. citri*  
335 pv. *citri* through the movement of contaminated planting materials, since it is the main way of

336 spreading the bacteria over long distances (Gottwald et al., 2002). This information is important  
337 for designing strategies to control the disease through exclusion measures.

338

### 339 **ACKNOWLEDGEMENTS**

340

341 We thank the Coordination of Superior Level Staff Improvement (CAPES) – Finance Code 001  
342 and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the  
343 scholarships awarded to Lucas Correia Santana Amancio.

344

### 345 **CONFLICTS OF INTEREST**

346 The authors declare no conflicts of interest

347

### 348 **ORCID**

349 Lucas C. S. Amancio - <https://orcid.org/0000-0003-0582-4191>

350 Valdir Q. Balbino - <https://orcid.org/0000-0002-4319-3952>

351 Marco A. S. Gama - <https://orcid.org/0000-0001-6153-1700>

352 Elineide B. Souza - <https://orcid.org/0000-0003-1281-3490>

353

### 354 **REFERENCES**

355

356 Amancio, L.C.S., Baia, A. D. B., Souza, E. B., Sales-Júnior, R., Negreiros, A. M. P., Balbino,  
357 V. Q. and Gama, M. A. S. (2021). First Report of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* causing Citrus  
358 Canker on lime in Rio Grande do Norte, Brazil. *Plant Disease*, 105, 4148.

359

360 Arshadi, F., Sijam, K., and Awang, Y. B. (2013) Genetic diversity of *Xanthomonas citri* subsp.  
361 *citri*, causal agent of citrus canker. *Journal of Plant Protection Research*, 53, 312-316.

362

363 Arshiya, M., Suryawanshi, A., More, D., and Baig, M. M. V. (2014) Repetitive PCR based  
364 detection of Genetic Diversity in *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* Strains. *Journal of Applied*  
365 *Biology and Biotechnology*, 2, 017-022.

366

367 Behlau, F. (2020a) An overview of citrus canker in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 46, 1-12.

368

- 369 Behlau, F., Gochez, A. M., and Jones, J. B. (2020b) Diversity and copper resistance of  
370 *Xanthomonas* affecting citrus. *Tropical Plant Pathology*, 45, 200-212.  
371
- 372 Bitancourt, A. (1957) O Cancro cítrico. *O Biológico*, 23, 110–111.  
373
- 374 Cubero, J., and Graham, J.H. (2002) Genetic relationship among worldwide strains of  
375 *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification  
376 by PCR. *Appl Environ Microbiol*, 68,1257–1264.  
377
- 378 Das, A.K. (2003) Citrus canker – a review. *Journal of Applied Horticulture*, 5, 52-60.
- 379 Edgar, R.C. (2004) Muscle: Multiple sequence alignment with high accuracy and high  
380 throughput. *Nucleic acids research*, 32, 1792-1797.  
381
- 382 Escalon, A., Javegny, S., Vernière, C., Noël, L. D., Vital, K., Poussier, S., and Gagnevin, L.  
383 (2013) Variations in type III effector repertoires, pathological phenotypes and host range of  
384 *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotypes. *Molecular plant pathology*, 5, 483-496.  
385
- 386 Fargier, E., Manceau, C. (2007) Pathogenicity assays restrict the species *Xanthomonas*  
387 *campestris* into three pathovars and reveal nine races  
388 within *X. campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathology*, 56, 805 – 818.  
389
- 390 Fargier, E., Saux, M. F. L., Manceau, C. (2011) A multilocus sequence analysis  
391 of *Xanthomonas campestris* reveals a complex structure within crucifer-attacking pathovars of  
392 this species. *Systematic and Applied Microbiology*, 34, 156– 65.  
393
- 394 Ferraz, H. G. M., Bandel, J.L., Guimarães, L.M.S., Reis, B.P., Tótola, M.R., Gonçalves,  
395 R.C.,Alfenas, A.C. (2018) *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalyptorum* pv. nov. causing ba te-  
396 rial leaf blight on eucalypt in Brazil. *The plant pathology journal*, 4, 269  
397
- 398 Ferreira, M. A. S. V., Bonneau, S., Briand, M., Cesbron, S., Portier, P., Darrasse, A., Gama, M.  
399 A. S., Barbosa, M. A. G., Mariano, R. L. M., Souza, E. B., Jacques, M. A. (2019) *Xanthomonas*  
400 *citri* pv. *viticola* affecting grapevine in Brazil: Emergence of a successful monomorphic  
401 pathogen. *Frontiers in plant science*, 10, 1-18.

- 402 Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2022. FAOSTAT. Roma.  
403 <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>  
404
- 405 Gama, M. A. S., Mariano, R. D. L. R., Silva Júnior, W. J., Farias, A. R. G., Barbosa, M. A. G.,  
406 Ferreira, M. Á. D. S. V., Souza, E. B. (2018) Taxonomic repositioning of *Xanthomonas*  
407 *campestris* pv. *viticola* (Nayudu 1972) dye 1978 as *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Nayudu  
408 1972) dye 1978 comb. nov. and emendation of the description of *Xanthomonas citri* pv.  
409 *anacardii* to include pigmented isolates pathogenic to cashew plant. *Phytopathology*, 108,  
410 1143-1153.  
411
- 412 Gama, M. A. S., Mariano, R. L. R., Viana, F. M. P., Ferreira, M. A. S. V., and Souza, E. B.  
413 (2011) Polyphasic characterization of pigmented isolates of *Xanthomonas* pathogenic to  
414 cashew trees. *Plant disease*, 95, 793-802.  
415
- 416 Gottwald, T. R., Graham, J. H. and Schubert, T. S. (2002) Citrus canker: the pathogen and its  
417 impact. *Plant health progress*, 3, 15.  
418
- 419 Graham, J.H., Gottwald, T.R., Cubero, J., and Achor, D.S. (2004) *Xanthomonas axonopodis*  
420 pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Mol Plant Pathol*, 5,1–15.  
421
- 422 Ibrahim, Y.E., Komy, M.E.E., Amer, M.A., Widyawan, A., and Saleh, M.A.A. (2019)  
423 Difficulties in identifying *Xanthomonas citri* subsp. *citri* A pathotypes. *Journal of Plant*  
424 *Pathology*, 101, 927-933.  
425
- 426 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2022. SIDRA. Rio de Janeiro.  
427 <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613#resultado>  
428
- 429 Lee, S.D., Lee, J.H., Lee, D.H., and Lee, Y.H. (2008) Diversity of pthA gene of *Xanthomonas*  
430 strains causing citrus bacterial canker and its relationship with virulence. *The Plant Pathology*  
431 *Journal*, 24, 357-360.  
432
- 433 Louws, E. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T., and Bruijn, F. J. (1994) Specific genomic  
434 fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and isolates

435 generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and environmental microbiology*, 60,  
436 2286-2295.

437

438 Louws, F.J., Bell, J., Medina-Mora, C.M., Smart, C.D., Opgenorth, D., Ishimaru, C.A.,  
439 Hausbeck, M.K., DeBruijn, F.J., and Fulbright, D.W. (1998) Rep-PCRmediated genomic  
440 fingerprinting: a rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*.  
441 *Phytopathology*, 88, 862–868.

442

443 Louws, F.J., Rademaker, J.L.W., and DeBruijn, F.J. (1999) The three Ds of PCR based genomic  
444 analysis of phytobacteria: diversity, detection and disease diagnosis. *Annual review of*  
445 *phytopathology*, 37, 81-125.

446

447 MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brazil (). 2017b. Secretaria de  
448 Defesa Agropecuária. Resolução nº 16, de 20 de setembro de 2017. Reconhecer o Estado de  
449 Sergipe como Área com Praga Ausente para o Cancro Cítrico (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*).  
450 [https://www2.camara.leg.br/comunicacao/rede-legislativa-radio\\_tv/arquivos/legislacao-](https://www2.camara.leg.br/comunicacao/rede-legislativa-radio_tv/arquivos/legislacao-arquivos/portarias-de-consignacao-radio/Portaria1199_28JUN2017_ConsignacaoFM_JATAI_GO.pdf)  
451 [arquivos/portarias-de-consignacao](https://www2.camara.leg.br/comunicacao/rede-legislativa-radio_tv/arquivos/legislacao-arquivos/portarias-de-consignacao-radio/Portaria1199_28JUN2017_ConsignacaoFM_JATAI_GO.pdf)  
452 [radio/Portaria1199\\_28JUN2017\\_ConsignacaoFM\\_JATAI\\_GO.pdf](https://www2.camara.leg.br/comunicacao/rede-legislativa-radio_tv/arquivos/legislacao-arquivos/portarias-de-consignacao-radio/Portaria1199_28JUN2017_ConsignacaoFM_JATAI_GO.pdf)

453

454 MAPA. Brazil Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brazil. 2017a. Secretaria  
455 de Defesa Agropecuária. Resolução nº 10, de 30 de março de 2017. Reconhecer o Estado da  
456 Bahia como Área com Praga Ausente para o Cancro Cítrico (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*).  
457 [https://www2.camara.leg.br/comunicacao/rede-legislativa-radio-tv/arquivos/legislacao](https://www2.camara.leg.br/comunicacao/rede-legislativa-radio-tv/arquivos/legislacao-arquivos/portarias-de-consignacao-radio/Portaria1199_28JUN2017_ConsignacaoFM_JATAI_GO.pdf)  
458 [arquivos/portarias-de-consignacao](https://www2.camara.leg.br/comunicacao/rede-legislativa-radio-tv/arquivos/legislacao-arquivos/portarias-de-consignacao-radio/Portaria1199_28JUN2017_ConsignacaoFM_JATAI_GO.pdf)  
459 [radio/Portaria1199\\_28JUN2017\\_ConsignacaoFM\\_JATAI\\_GO.pdf](https://www2.camara.leg.br/comunicacao/rede-legislativa-radio-tv/arquivos/legislacao-arquivos/portarias-de-consignacao-radio/Portaria1199_28JUN2017_ConsignacaoFM_JATAI_GO.pdf)

460

461 MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brazil. 2017c. Secretaria de  
462 Defesa Agropecuária. Resolução nº 17, de 28 de setembro de 2017. Reconhecer o Estado de  
463 Pernambuco como Área com Praga Ausente para o Cancro Cítrico (*Xanthomonas citri* subsp.  
464 *citri*). [https://sidago.agrodefesa.go.gov.br/site/adicionaispropios/protocolo/arquivos/722249.](https://sidago.agrodefesa.go.gov.br/site/adicionaispropios/protocolo/arquivos/722249.pdf)  
465 [df](https://sidago.agrodefesa.go.gov.br/site/adicionaispropios/protocolo/arquivos/722249.pdf)

466

467 MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brazil. 2017d. Secretaria de  
468 Defesa Agropecuária. Resolução nº 19, de 8 de dezembro de 2017. Reconhecer o Estado da



- 469 Paraíba como Área com Praga Ausente para o Cancro Cítrico (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*).  
470 <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-n-19-de-8-de-dezembro-de-2017-986672>  
471
- 472 MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brazil. 2018. Secretaria de  
473 Defesa Agropecuária. INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 38, de 1° de outubro de 2018.  
474 Estabelecer, na forma do Anexo desta Instrução Normativa, a lista de Pragas Quarentenárias  
475 Presentes (PQP) para o Brasil.  
476 <https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=02/10/2018&jornal=5>  
477 [5&pagina=14](#)  
478
- 479 Mohammadi, M., Mirzaee, M.R., and Rahimian, H. (2001) Physiological and biochemical  
480 characteristics of Iranian strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the causal agente of  
481 citrus bacterial canker disease. *Journal of Phytopathology*, 149, 65-75.  
482
- 483 Neves, M. F., and Trombin, V. G. (2017) Anuário da citricultura 2017. *CitrusBR, São Paulo,*  
484 *Brasil.*  
485
- 486 Pavlicek, A., Hrd'á, S., and Flegr, J. (1999) FreeTree–freeware program for construction of  
487 phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/ jackknife analysis of the  
488 robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frekelia*. *Folia Biologica (Praba)*, 45,  
489 97-99.  
490
- 491 Pruvost, O., Goodarzi, T., Boyer, K., Soltaninejad, H., Escalon, A., Alavi, S., Javegny, S.,  
492 Boyer, C., Cottyn, B., and Gagnevin, L. (2015) Genetic structure analysis of strains causing  
493 citrus canker in Iran reveals the presence of two different lineages of *Xanthomonas citri* pv.  
494 *citri* pathotype A. *Plant pathology*, 64, 776-784.  
495
- 496 Sun, X., Stall, R., Jones, J., Cubero, J., Gottwald, T., Graham, J., Dixon, W.N., Schubert, T.S.,  
497 Chaloux, P.H., Stromberg, V.K., Lacy, G.H., Sutton, B.D. (2004) Detection and  
498 characterization of a new strain of citrus canker bacteria from key Mexican lime and Alemow  
499 in South Florida. *Plant Disease* 88, 1179–1188  
500
- 501 Tamura, K., Stecher, G., and Kumar, S. (2021) MEGA11: molecular evolutionary genetics  
502 analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38, 3022-3027.

- 503 United States Department of Agriculture. 2022. Foreign Agricultural Service. Citrus: World  
504 Markets and Trade. <https://www.fas.usda.gov/data/citrus-world-markets-and-trade>  
505
- 506 Vernière, C., Hartung, J. S., Pruvost, O. P., Civerolo, E. L., Alvarez, A. M., Maestri, P., and  
507 Luisetti, J. (1998) Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas*  
508 *axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. *European Journal of Plant Pathology*, 104, 477-  
509 487.
- 510
- 511 Young, J. M., Park, D. C., Shearman, H. M., and Fargier, E. (2008) A multilocus sequence  
512 analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and applied microbiology*, 31, 366-377.
- 513
- 514
- 515

**Supplementary Table 1.** Description of the *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strains used in this study that were obtained originally from northeastern Brazil.

<b>Strains<sup>x</sup></b>	<b>City/state</b>	<b>Host<sup>y</sup></b>
CCRMXC01	Mossoró - RN	<i>Citrus aurantifolia</i>
CCRMXC02	Mossoró - RN	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC03	Mossoró - RN	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC04	Mossoró - RN	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC05	Mossoró - RN	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC06	Mossoró - RN	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC07	Mossoró - RN	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC08	Mossoró - RN	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC09 <sup>z</sup>	Mossoró - RN	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC10	Mossoró - RN	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC11	Mossoró - RN	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC12	Mossoró - RN	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC13	Mossoró - RN	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC14	Mossoró - RN	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC15 <sup>z</sup>	Mossoró - RN	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC16	Mossoró - RN	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC18	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC19	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC20	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC21	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC22	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC23	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC24	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC25	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC26	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>

---

CCRMXC27	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC28	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC29	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC30	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC31	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC32	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC33	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC34	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC35 <sup>z</sup>	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC36	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC37	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC38	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC39	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC40	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC41	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC42	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC43	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC44	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC45	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC46	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC47	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC48	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC49	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC50	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC51	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC52	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC53	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC54	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>

---

---

CCRMXC55	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC56	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC57	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC58	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC59	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC60	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC61	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC62	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC63	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC64	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC65	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC66	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC67	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC68	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC69 <sup>z</sup>	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC70	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC71	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC72	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC73	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC74	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC75	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC76	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC77	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC78	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC79	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC80	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC81	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC82	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>

---

---

CCRMXC83	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC84	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC84.2	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC85	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC86	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC87	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC88	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC89	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC90	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC91	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC92	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC93	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC94	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC95	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC96	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC97	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC98	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC99	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC100	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC101	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC102	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC103	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC104	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC105	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC106	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC107	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC108	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC109	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>

---

---

CCRMXC110	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC111	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC112	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC112.2	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC113	Teresina - PI	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC114	Teresina - PI	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC115	Teresina - PI	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC116	Teresina - PI	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC117	Teresina - PI	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC118	Teresina - PI	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC119	Teresina - PI	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC120	Teresina - PI	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC121	Teresina - PI	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC122 <sup>z</sup>	Teresina - PI	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC123	Teresina - PI	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC124	Teresina - PI	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC125	Teresina - PI	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC126	Teresina - PI	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC127	Teresina - PI	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC128	Teresina - PI	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC129	Teresina - PI	<i>Citrus sinensis</i>
CCRMXC130 <sup>z</sup>	Teresina - PI	<i>C. sinensis</i>
CCRMXC131	Teresina - PI	<i>C. sinensis</i>
CCRMXC132	Teresina - PI	<i>C. sinensis</i>
CCRMXC133	Teresina - PI	<i>C. sinensis</i>
CCRMXC134	Teresina - PI	<i>C. sinensis</i>
CCRMXC135	Teresina - PI	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC136	Teresina - PI	<i>C. aurantifolia</i>

---

CCRMXC137	Teresina - PI	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC138	Teresina - PI	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC139	Teresina - PI	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC140	Teresina - PI	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC141	Teresina - PI	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC142	Teresina - PI	<i>C. aurantifolia</i>

<sup>x</sup>CCRM: isolates from the Laboratory of Phytobacteriology (LAFIBAC) Culture Collection of Federal Rural University of Pernambuco-UFRPE (Pernambuco, Brazil).

<sup>y</sup>RN = Rio Grande do Norte state, CE = Ceará State, PI = Piauí state.

<sup>z</sup> Isolates used in the Multilocus sequence analysis (MLSA)



- 1 **Supplementary Table 2.** Multilocus sequences of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strains selected  
 2 based on rep-PCR assay and used in MLSA analysis.

Isolate code	Gene	Host plant	Geographic origin	GenBank accession no.
CCRMXC09	<i>dnaK</i>	<i>C. aurantifolia</i>	Brazil	ON731778
CCRMXC15	<i>dnaK</i>	<i>C. aurantifolia</i>	Brazil	ON731779
CCRMXC35	<i>dnaK</i>	<i>C. aurantifolia</i>	Brazil	ON731780
CCRMXC69	<i>dnaK</i>	<i>C. aurantifolia</i>	Brazil	ON731781
CCRMXC122	<i>dnaK</i>	<i>C. aurantifolia</i>	Brazil	ON731782
CCRMXC130	<i>dnaK</i>	<i>C. sinensis</i>	Brazil	ON731783
CCRMXC09	<i>fyuA</i>	<i>C. aurantifolia</i>	Brazil	ON731784
CCRMXC15	<i>fyuA</i>	<i>C. aurantifolia</i>	Brazil	ON731785
CCRMXC35	<i>fyuA</i>	<i>C. aurantifolia</i>	Brazil	ON731786
CCRMXC69	<i>fyuA</i>	<i>C. aurantifolia</i>	Brazil	ON731787
CCRMXC122	<i>fyuA</i>	<i>C. aurantifolia</i>	Brazil	ON731788
CCRMXC130	<i>fyuA</i>	<i>C. sinensis</i>	Brazil	ON731789
CCRMXC09	<i>gyrB</i>	<i>C. aurantifolia</i>	Brazil	ON731790
CCRMXC15	<i>gyrB</i>	<i>C. aurantifolia</i>	Brazil	ON731791
CCRMXC35	<i>gyrB</i>	<i>C. aurantifolia</i>	Brazil	ON731792
CCRMXC69	<i>gyrB</i>	<i>C. aurantifolia</i>	Brazil	ON731793
CCRMXC122	<i>gyrB</i>	<i>C. aurantifolia</i>	Brazil	ON731794
CCRMXC130	<i>gyrB</i>	<i>C. sinensis</i>	Brazil	ON731795
CCRMXC09	<i>rpoD</i>	<i>C. aurantifolia</i>	Brazil	ON731796
CCRMXC15	<i>rpoD</i>	<i>C. aurantifolia</i>	Brazil	ON731797
CCRMXC35	<i>rpoD</i>	<i>C. aurantifolia</i>	Brazil	ON731798

---

CCRMXC69	<i>rpoD</i>	<i>C. aurantifolia</i>	Brazil	ON731799
CCRMXC122	<i>rpoD</i>	<i>C. aurantifolia</i>	Brazil	ON731800
CCRMXC130	<i>rpoD</i>	<i>C. sinensis</i>	Brazil	ON731801

---

3

4

**Supplementary Table 3.** BLASTn analyzes of the sequences of *dnaK*, *fyuA*, *gryB*, and *rpoD* genes of the strains selected on rep-PCR assay and used in MLSA analysis with representatives strains of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* available in Genbank.

Strain <sup>x</sup>	BLAST <i>dnaK</i> %	BLAST <i>fyuA</i> %	BLAST <i>gryB</i> %	BLAST <i>rpoD</i> %
CCRMXC09	100-Xcc1 <sup>y</sup>	100-Xcc1	100-Xcc1	100-Xcc1
CCRMXC09	100-Xcc2	100-Xcc2	100-Xcc2	100-Xcc2
CCRMXC09	100-Xcc3	100-Xcc3	99,86-Xcc3	100-Xcc3
CCRMXC15	100-Xcc1	100-Xcc1	100-Xcc1	100-Xcc1
CCRMXC15	100-Xcc2	100-Xcc2	100-Xcc2	100-Xcc2
CCRMXC15	100-Xcc3	100-Xcc3	99,86-Xcc3	100-Xcc3
CCRMXC35	100-Xcc1	100-Xcc1	100-Xcc1	100-Xcc1
CCRMXC35	100-Xcc2	100-Xcc2	100-Xcc2	100-Xcc2
CCRMXC35	100-Xcc3	100-Xcc3	99,86-Xcc3	100-Xcc3
CCRMXC69	100-Xcc1	100-Xcc1	100-Xcc1	100-Xcc1
CCRMXC69	100-Xcc2	100-Xcc2	100-Xcc2	100-Xcc2
CCRMXC69	100-Xcc3	100-Xcc3	99,86-Xcc3	100-Xcc3
CCRMXC122	100-Xcc1	100-Xcc1	100-Xcc1	100-Xcc1
CCRMXC122	100-Xcc2	100-Xcc2	100-Xcc2	100-Xcc2
CCRMXC122	100-Xcc3	100-Xcc3	99,86-Xcc3	100-Xcc3
CCRMXC130	100-Xcc1	100-Xcc1	100-Xcc1	100-Xcc1
CCRMXC130	100-Xcc2	100-Xcc2	100-Xcc2	100-Xcc2
CCRMXC130	100-Xcc3	100-Xcc3	99,86-Xcc3	100-Xcc3

<sup>x</sup>CCRM: isolates from the Laboratory of Phytobacteriology (LAFIBAC) Culture Collection of Federal Rural University of Pernambuco-UFRPE (Pernambuco, Brazil).

<sup>y</sup>ICMP 24 (Xcc1); ICMP 7493 (Xcc2); ICMP 21(Xcc3).

**Supplementary Table 4.** *Xanthomonas* strains used in multilocus sequence analysis (MLSA) available in GenBank

Species	Synonym	Strain	GenBank Accession number			
			<i>dnaK</i>	<i>fyuA</i>	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>
<i>Xanthomonas albilineans</i> <sup>a</sup>		ICMP 196	-		EU498963	EU499082
<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> <sup>a</sup>		ICMP 35	EU498750	EU498852	EU498951	EU499070
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>axonopodis</i> <sup>a</sup>		ICMP 50	EU498751	EU498853	EU498952	EU499071
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>allii</i>		CFBP 6369	CM002866	CM002866	CM002866	CM002866
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>alfalfae</i> <sup>b</sup>	<i>X. alfalfae</i> subsp. <i>alfalfae</i>	ICMP 5718	EU498792	EU498894	EU499001	EU499120
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i>	<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i>	ICMP 8432	EU498811	EU498913	EU499027	EU499146
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i> <sup>b</sup>		ICMP 194	EU498757	EU498859	EU498962	EU499081
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>cajani</i> <sup>b</sup>		ICMP 444	EU498767	EU498869	EU498973	EU499092
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> <sup>a</sup>	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	ICMP 24	EU498749	EU498851	EU498950	EU499069
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citrumelo</i>	<i>X. alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i>	ICMP 10009	EU498826	EU498926	EU499042	EU499162
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>commiphorae</i>		DXD 01	JN898928	JN621250	JN621253	JN621257
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>dieffenbachiae</i>		LMG 695	CP014347	CP014347	CP014347	CP014347
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> <sup>b</sup>		ICMP 5732	EU498794	EU498896	EU499003	EU499122
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	<i>X. citri</i> subsp. <i>malvacearum</i>	ICMP 217	EU498760	EU498862	EU498966	EU499085
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i>		LMG 941	CAHO01000008	-	CAHO01000012	CAHO01000002
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> <sup>b</sup>		ICMP 5741	EU498796	EU498898	EU499006	EU499125
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> <sup>b</sup>	<i>X. phaseoli</i>	ICMP 5834	EU498802	EU498904	EU499015	EU499134
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> (biovar. <i>fuscans</i> ) <sup>a</sup>	<i>X. fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i>	ICMP 239	EU498761	EU498863	EU498967	EU499086
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>punicae</i>		NCPPB 466	JN790906	JN790914	JN790930	JN790938
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>ricini</i>		ICMP 3031	EU498782	EU498884	EU498991	EU499110
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i> <sup>b</sup>		ICMP 5757	EU498798	EU498900	EU499011	EU499130
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vignicola</i> <sup>b</sup>		ICMP 333	EU498764	EU498866	EU498970	EU499089
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> <sup>a</sup>	<i>X. euvesicatoria</i>	ICMP 109	EU498754	EU498856	EU498955	EU499074
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> <sup>a</sup>	<i>X. perforans</i>	ICMP 16690	EU498844	EU498944	EU499059	EU499179
<i>X. bromi</i> <sup>a</sup>		ICMP 12545	EU498837	EU498937	EU499052	EU499172

<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	ICMP 6541	EU498805	EU498907	EU499018	EU499137
<i>X. cassavae</i> <sup>a</sup>	ICMP 204	EU498759	EU498861	EU498965	EU499084
<i>X. codiae</i> <sup>a</sup>	ICMP 9513	EU498822	EU498922	EU499038	EU499158
<i>X. cucurbitae</i> <sup>a</sup>	ICMP 2299	EU498780	EU498882	EU498989	EU499108
<i>X. cynarae</i> <sup>a</sup>	ICMP 16775	EU498846	EU498946	EU499061	EU499181
<i>X. dyei</i> pv. <i>dysoxyl</i> <sup>a</sup>	ICMP 2415	EU498781	EU498883	EU498990	EU499109
<i>X. frageriae</i> <sup>a</sup>	ICMP 5715	EU498791	EU498893	EU499000	EU499119
<i>X. gardneri</i> <sup>a</sup>	ICMP 16689	EU498843	EU498943	EU499058	EU499178
<i>X. hortorum</i> <sup>a</sup>	ICMP 453	EU498769	EU498871	EU498975	EU499094
<i>X. hyacinthi</i> <sup>a</sup>	ICMP 189	-	-	EU498960	EU499079
<i>X. melonis</i>	ICMP 8683	EU498816	EU498916	EU499032	EU499152
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> <sup>a</sup>	ICMP 3125	EU498784	EU498886	EU498993	EU499112
<i>X. pisti</i> <sup>a</sup>	ICMP 570	EU498770	EU498872	EU498976	EU499095
<i>X. populi</i> <sup>a</sup>	ICMP 5816	EU498801	EU498903	EU499014	EU499133
<i>X. sacchari</i> <sup>a</sup>	ICMP 16916	-	-	EU499063	EU499183
<i>X. theicola</i> <sup>a</sup>	ICMP 6774	-	-	EU499020	EU499139
<i>X. translucens</i> pv. <i>translucens</i> <sup>a</sup>	ICMP 5752	-	-	EU499009	EU499128
<i>X. vasicola</i> <sup>a</sup>	ICMP 3103	EU498783	EU498885	EU498992	EU499111
<i>X. vesicatoria</i> <sup>a</sup>	ICMP 63	EU498753	EU498855	EU498954	EU499073
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <sup>a</sup>	ICMP 17033	EU498848	-	EU499066	EU499186
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>anacardii</i>	CFBP 2913	CP024057	CP024057	CP024057	CP024057
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>bilvae</i>	CFBP 3136	KY984128	KY984161	KY984194	KY984227

(**CFBP**)- Collection Française de Bactéries Phytopathogènes; (**ICMP**)- International Collection of Microorganisms from Plants;  
**(LMG) - BCCM/LMG** Bacteria Collection, Laboratory for Microbiology; (**NCPBB**)- National Collection of Plant Pathogenic Bacteria;  
**(IBSBF)**- Coleção de Culturas de Fitobactérias- IBSBF (Instituto Biológico). <sup>a</sup>Type strain of species / <sup>b</sup>Pathotype strain

**Supplementary table 5.** Biochemical characters of the *Xanthomonas citri* subsp *citri* strains selected on rep-PCR assay and used in MLSA analysis.

<b>Biochemical test</b>	<b>CCRMXC 09</b>	<b>CCRMXC15</b>	<b>CCRMXC35</b>	<b>CCRMXC69</b>	<b>CCRMXC122</b>	<b>CCRMXC130</b>
Negative Control	-	-	-	-	-	-
Dextrin	+	+	+	+	+	+
D-Maltose	+	+	+	+	+	+
D-Trehalose	+	+	+	+	+	+
D-Cellobiose	+	+	+	+	+	+
Gentiobiose	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+
D-Turanose	+	+	+	+	+	+
Stachyose	+	+	+	+	+	+
Positive Control	-	-	-	-	-	-
pH 6	+	+	+	+	+	+
pH 5	-	-	-	-	-	-
D-Raffinose	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -D-Lactose	-	-	-	-	-	-
D-Melibiose	+	+	+	+	+	+
$\beta$ -Methyl-D-glucoside	-	-	-	-	-	-
D-Salicin	-	-	-	-	-	-
N-Acetyl- $\beta$ -Dmannosamine	-	-	-	-	-	-

N-Acetyl-D-galactosamine	+	+	+	+	+	+
N-Acetyl Neuraminic Acid	-	-	-	-	-	-
1% NaCl	+	+	+	+	+	+
4% NaCl	-	-	-	-	-	-
8% NaCl	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -D-Glucose	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+
D-Galactose	+	+	+	+	+	+
3-Methyl Glucose	-	-	-	-	-	-
D-Fucose	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	+	+	+	+	+	+
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-
Inosine	-	-	-	-	-	-
1% Sodium Lactate	+	+	+	+	+	+
Fusidic Acid	-	-	-	-	-	-
D-Serine	-	-	-	-	-	-
D-Sorbito	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-
myo-Inositol	-	-	-	-	-	-
Glycerol	+	+	+	+	+	+

---

D-Glucose6-PO4	-	-	-	-	-	-
D-Fructose6-PO4	-	-	-	-	-	-
D-Aspartic Acid	-	-	-	-	-	-
D-Serine	-	-	-	-	-	-
Troleandomycin	-	-	-	-	-	-
Rifamycin SV	+	+	+	+	+	+
Minocycline	-	-	-	-	-	-
Gelatin	+	+	+	+	+	+
Glycyl-L-Proline	+	+	+	+	+	+
L-Alanine	+	+	+	+	+	+
L-Arginine	-	-	-	-	-	-
L-Aspartic Acid	+	+	+	+	+	+
L-Glutamic Acid	+	+	+	+	+	+
L-Histidine	-	-	-	-	-	-
L-Pyroglutamic Acid	-	-	-	-	-	-
L-Serine	+	+	+	+	+	+
Lincomycin	+	+	+	+	+	+
Guanidine HCl	-	-	-	-	-	-
Niaproof 4	-	-	-	-	-	-
Pectin	+	+	+	+	+	+
D-Galacturonic Acid	+	+	+	+	+	+
L-Galactonic Acid Lactone	-	-	-	-	-	-

---



---

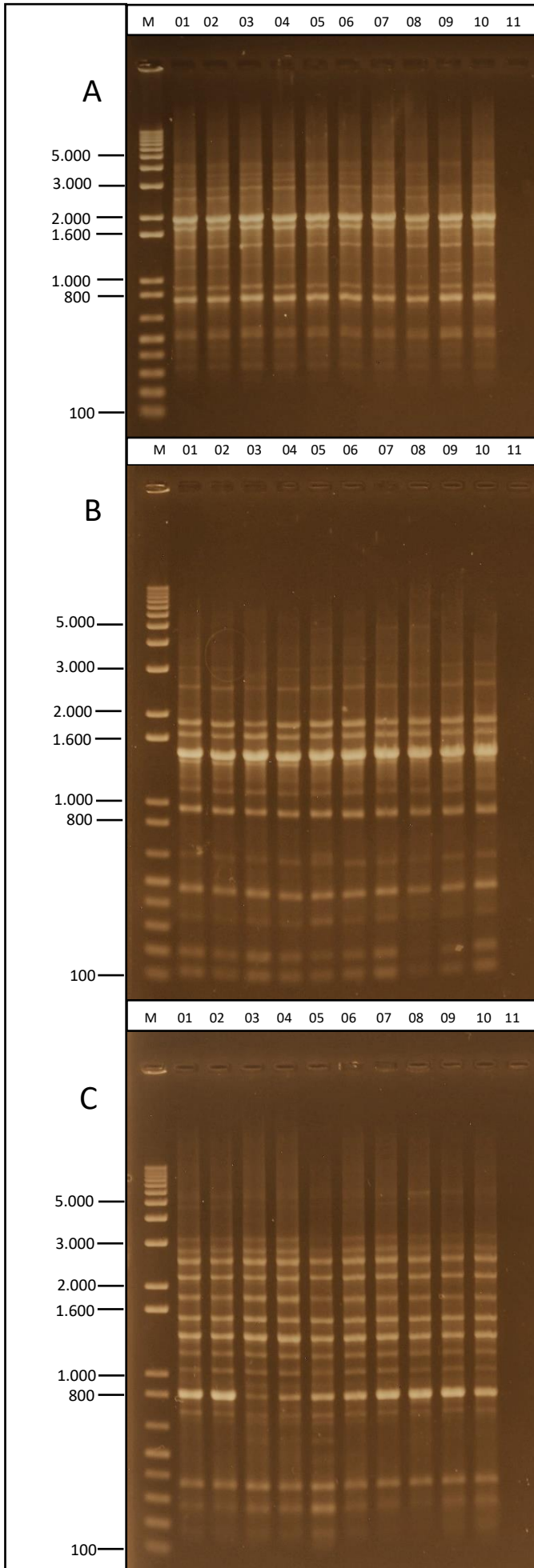
D-Gluconic Acid	+	+	+	+	+	+
D-Glucuronic Acid	-	-	-	-	-	-
Glucuronamide	+	+	+	+	+	+
Mucic Acid	+	+	+	+	+	+
Quinic Acid	-	-	-	-	-	-
D-Saccharic Acid	-	-	-	-	-	-
Vancomycin	-	-	-	-	-	-
Tetrazolium Violet	+	+	+	+	+	+
p-HydroxyPhenylacetic Acid	-	-	-	-	-	-
Methyl Pyruvate	+	+	+	+	+	+
D-Lactic Acid Methyl Ester	-	-	-	-	-	-
L-Lactic Acid	-	-	-	-	-	-
Citric Acid	+	+	+	+	+	+
$\alpha$ -Keto-Glutaric Acid	+	+	+	+	+	+
D-Malic Acid	+	+	+	+	+	+
L-Malic Acid	-	-	-	-	-	-
Bromo-Succinic Acid	+	+	+	+	+	+
Nalidixic Acid	-	-	-	-	-	-
Lithium Chloride	-	-	-	-	-	-
Potassium Tellurite	-	-	-	-	-	-
Tween 40	+	+	+	+	+	+
$\gamma$ -Amino-Butyric Acid	-	-	-	-	-	-

---

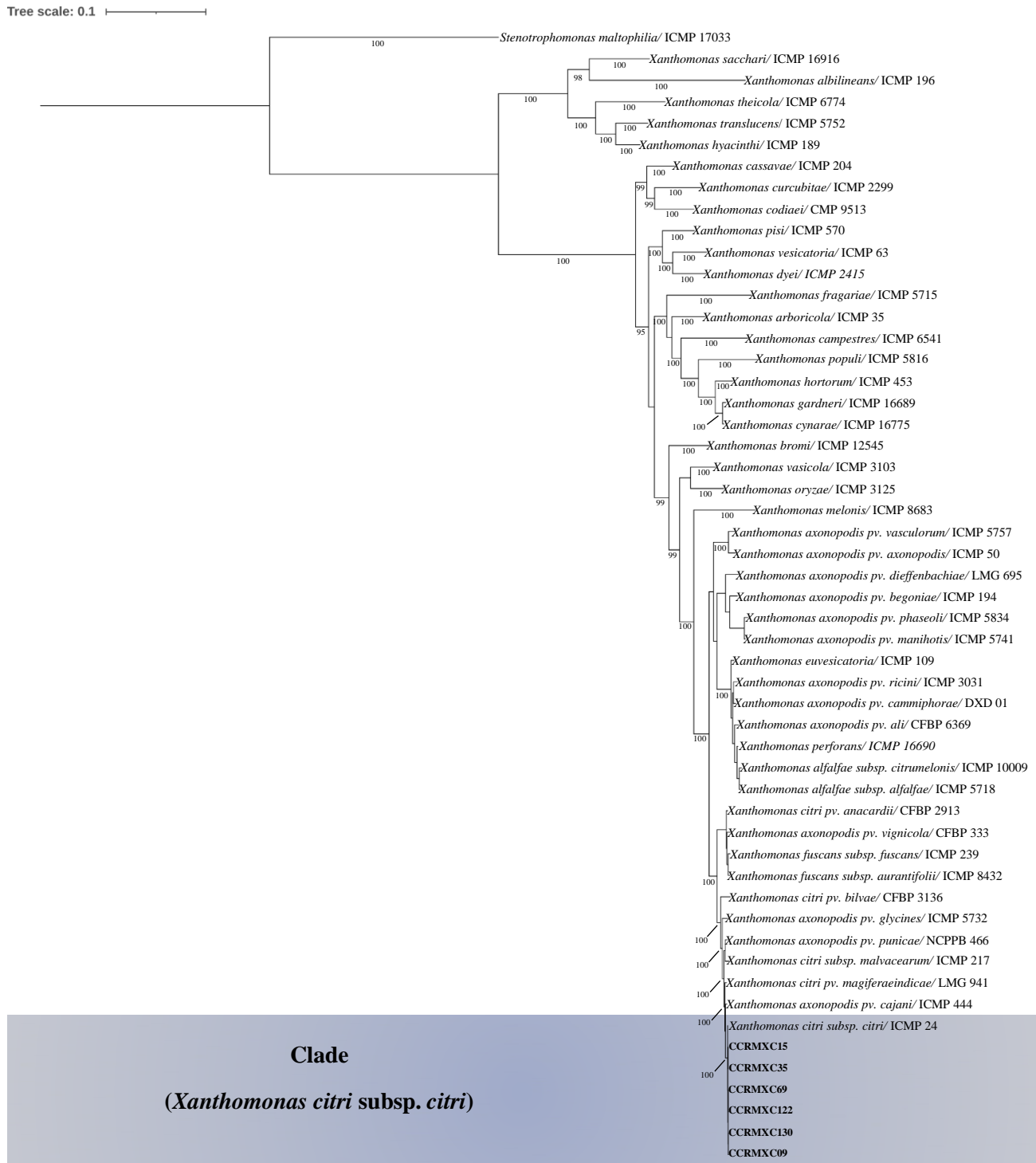
---

$\alpha$ -HydroxyButyric Acid	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -Hydroxy-D,LButyric Acid	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Keto-Butyric Acid	+	+	+	+	+	+
Acetoacetic Acid	+	+	+	+	+	+
Propionic Acid	+	+	+	+	+	+
Acetic Acid	+	+	+	+	+	+
Formic Acid	+	+	+	+	+	+
Aztreonam	-	-	-	-	-	-
Sodium Butyrate	-	-	-	-	-	-
Sodium Butyrate	-	-	-	-	-	-

---



**Figure 1** DNA fingerprinting patterns from strains of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* by BOX-PCR (A), REP-PCR (B) and ERIC-PCR (C); M = Molecular marker (1-KB plus ladder marker); 1 = CCRMXC09; 02 = CCRMXC20; 03 = CCRMXC35; 04 = CCRMXC36; 05 = CCRMXC69; 06 = CCRMXC74; 07 = CCRMXC100; 08 = CCRMXC108; 09 = CCRMXC122; 10 = CCRMXC130; 11 = water (H<sub>2</sub>O).



**Figure 2** Phylogenetic analysis performed by Bayesian inference from the partial sequence of the *dnaK*, *fyuA*, *gyrB*, and *rpoD* genes showing the strains CCRMXC09, CCRMXC15, CCRMXC35, CCRMXC69, CCRMXC122, and CCRMXC130, selected on rep-PCR assay, grouped along with the type strain of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (ICMP 24T). Posterior probability values > 0.90 are shown on the branches.



**Figure 3** Pathological characterization of strains of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* from northeastern Brazil on different citrus cultivars. Characteristic symptoms of citrus canker in these citrus species indicate that the strains are pathotype A

## Capítulo IV

---

---

**Sensitivity of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strains from Northeast Brazil to copper-based bactericides and description of plants of the Anacardiaceae family as putative hosts**

**Short Communication**

1 **Sensitivity of *Xanthomonas citri* subsp *citri* strains from Northeast Brazil to copper-based**  
2 **bactericides and description of plants of the Anacardiaceae family as putative hosts**

3  
4 **Lucas Correia Santana Amancio<sup>1</sup> · Rui Sales Júnior<sup>2</sup> · Marco Aurélio Siqueira da Gama<sup>1</sup>**  
5 **Keyla Walescka Lopes da Silva<sup>1</sup> · Igor Alexandre de Melo Pimentel<sup>1</sup> · Elineide Barbosa**  
6 **de Souza<sup>3</sup>**

7  
8 <sup>1</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

9 <sup>2</sup>Departamento de Ciências Vegetais, Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró,  
10 RN, Brazil

11 <sup>3</sup>Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

12  
13 **Abstract**

14  
15 Citrus canker disease is one of the main threats to citrus-producing in Brazil. This disease is  
16 caused by the bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*), classified as a quarantine  
17 organism. This bacterium is little studied in the Northeast of Brazil, increasing the concern due  
18 to its destructive potential. Thus, the present study aimed to characterize the sensitivity of *Xcc*  
19 strains obtained from Northeast Brazil to copper-based bactericides through *in-vitro* and  
20 molecular tests and study the ability of plants not belonging to the family Rutaceae to serve as  
21 hosts of *Xcc*. *In vitro* sensitivity tests to copper-based products in solid media showed that all  
22 strains have the same sensitivity to copper oxychloride and copper hydroxide. Specific primers  
23 previously designed to amplify the *CopLAB* cluster genes revealed the absence of copper  
24 resistance strains (Cu<sup>R</sup>). Cross-inoculation experiments showed that strains of the *Xcc* can  
25 survive when inoculated artificially on leaves of cashew, mastic, and mango. To our knowledge,  
26 this also is the first report of *Xcc* surviving on plants belonging to the Anacardiaceae family in  
27 Brazil and worldwide. This information will be useful in designing strategies to control citrus  
28 canker.

29  
30 **Keywords**

31 *CopA* · *CopB* · *CopL* · Cross-inoculation

32

33

34 Citrus Canker, caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*), is one the most important disease  
35 on citrus in Brazil and worldwide (Gottwald et al. 2002; Behlau et al. 2020). Chemical control  
36 with copper-based bactericides is the main way to minimize the losses caused by this disease  
37 (Scapin et al. 2015; Behlau et al. 2017; Marin et al. 2019). The most commonly used copper  
38 formulations contain copper oxychloride, copper hydroxide or cuprous oxide (Behlau et al.  
39 2017; Graham et al. 2016). The sprays promote a protective layer when applied on young leaves  
40 and fruit, preventing or hindering the penetration of *Xcc* by natural openings, stomata or wounds  
41 (Menkissoglu and Lindow 1991). However, the continuous use of these bactericides may  
42 induce the emergence of *Xcc* populations resistant to copper (Behlau et al. 2011, 2013; Richard  
43 et al. 2017), reducing the effectiveness of disease control.

44 Copper-resistant strains ( $\text{Cu}^{\text{R}}$ ) have been detected in populations of several species of  
45 phytopathogenic bacteria (Lee et al. 1994; Behlau et al. 2013; Voloudakis et al., 2005; Basim  
46 et al. 2005), including *Xcc* (Behlau et al. 2011; Richard et al. 2017). The first  $\text{Cu}^{\text{R}}$  strains  
47 reported in *Xcc* occurred in 1990 in Argentina, when the numerous copper sprays used to control  
48 of recurrent outbreaks of citrus canker showed a lack of response (Behlau et al. 2011; Canteros  
49 1999). Recently,  $\text{Cu}^{\text{R}}$  strains of *Xcc* were also detected in the French territories of Reunion  
50 Island and Martinique (Richard et al. 2017). There are no reports of  $\text{Cu}^{\text{R}}$  strains of *Xcc* in Brazil.  
51 However, recently strains of the Paraná that showed the ability to develop on medium amended  
52 with intermediate concentrations of copper was reported and were named tolerant strains ( $\text{Cu}^{\text{T}}$ )  
53 (Marin et al. 2019)

54 Copper resistance in xanthomonads strains is conferred by several genes, *copLAB*  
55 (Behlau et al. 2011, 2013) and *copABCD* (Behlau et al. 2011; Richard et al. 2017a, 2017b).  
56 These genes were detected on plasmids, facilitating their horizontal transfer between different  
57 strains through the conjugation mechanism (Behlau et al., 2011, 2012, 2013). The copper  
58 sequestration and accumulation was suggest as primary copper resistance mechanism in  
59 *Xanthomonas* (Cooksey, 1990, Voloudakis et al., 2005). In the *copLAB* cluster, *copL* regulates  
60 the expression of *copA* and *copB*, which encode for copper-binding proteins (Cooksey 1990;  
61 Voloudakis et al. 2005). In the *copABCD* cluster, the *copA* and *copC* genes encode periplasmic  
62 proteins that bind copper ions and are responsible for the partial resistance of *Pseudomonas*  
63 *syringae* to copper. The *copB* and *copD* genes encode outer and inner membrane proteins  
64 necessary for complete resistance (Cooksey 1993). However, in *Xcc* only the *copL*, *copA*, and  
65 *copB* genes were essential for copper resistance (Behlau et al. 2011).

66 In Northeast Brazil, Ceará (CE) is the only state recognized as an area under eradication  
67 of citrus canker (Behlau et al. 2020), where applications of copper-based bactericides have been



68 employed. Maranhão (MA), Piauí (PI) and, Rio Grande do Norte (RN) are states where citrus  
69 canker was recently detected (Behlau et al. 2020; Amancio et al. 2021), increasing concern  
70 about the progress of citrus canker in Northeast Brazil in recent years. In this region, the  
71 presence of copper-resistant strains is unknown (Behlau et al. 2011; Richard *et al.* 2017).

72 In addition, the possibility of non-Rutaceae plants serving as hosts of commonly near  
73 areas where citrus species are cultivated in this region has never been studied. In a study carried  
74 out in India, Kalita et al. (1997) reported that goat weed *Ageratum conyzoides* L., plant  
75 commonly found in citrus orchards serves as a host of *Xcc*, being considered to date the only  
76 report of non-rutaceous plants as host of *Xcc*. This information is essential for designing disease  
77 control strategies, as *Xanthomonas* diseases probably also occur on many wild plant species of  
78 no economic importance and which have received little or no attention. Thus, this study aimed  
79 to characterize the sensitivity of strains of *Xcc* obtained from Northeast Brazil to copper  
80 hydroxide and copper oxychloride, investigate the involvement of *CopLAB* cluster genes in  
81 bacterial copper resistance, and study the possibility of non-Rutaceae plants serving as  
82 alternative hosts for *Xcc*.

83 Thirteen strains from the Cultures Collection Rosa Mariano (CCRM) of the  
84 Phytobacteriology Laboratory at Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE) were  
85 obtained (Table 1). They were isolated from different citrus-producing areas Northeast Brazil  
86 in 2021. The strains were obtained from the leaf samples collected in Mexican lime (*Citrus*  
87 *aurantifolia* L. cv. galego) and oranges (*Citrus sinensis* L. cv. Pêra) orchards. These strains  
88 were previously characterized by Amancio (2022).

89 In separate experiments, the sensitivity of the strains to copper hydroxide and copper  
90 oxychloride in solid media was studied according to Behlau et al. (2011), with minor  
91 modifications. To induce the expression of the possible copper resistance or tolerance genes,  
92 individual colonies of the strains were cultured at 28° C for 24 h on nutrient-yeast extract-  
93 dextrose-agar (NYDA) medium (3 g/liter meat extract, 5 g/liter peptone, 10 g/liter glucose, 5  
94 g/liter yeast extract, 22 g/liter agar,) supplemented with low and non-inhibitory concentration  
95 of 20 mg/liter of copper hydroxide and copper oxychloride (Behlau et al. 2011; Marin et al.  
96 2019). Subsequently, bacterial suspensions prepared from the colonies obtained from NYDA +  
97 Cu were standardized to 10<sup>8</sup> CFU/ml and transferred (10 µl) to plates containing NYDA  
98 supplemented with different concentrations of copper hydroxide and copper oxychloride (0, 25,  
99 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, and 400 mg/liter). The plates were incubated at 28° C for  
100 96 h and evaluated for the presence of bacterial growth.

101 To investigate the presence of the copper resistance genes, all the strains used in the  
102 sensitivity test were submitted to DNA extraction according to Gama et al. (2011). Specific  
103 primers previously designed based on the Cu<sup>R</sup> strains were used to amplify the *copA*, *copB*, and  
104 *copL* genes of the cluster *CopLAB* (Behlau et al. 2011; Behlau et al. 2013). PCR analysis were  
105 performed according to Behlau et al. (2011).

106 In separate experiments, the strains listed in Table 1 were inoculated on the leaves of  
107 cashew (*Anacardium occidentale*), hog plum (*Spondias mombin*), mastic (*Schinus  
108 terebinthifolia* ‘red-mastic’), grape (*Vitis vinifera* cv. Núbia), mango (*Mangifera indica* cv.  
109 Espada), and lime (*Citrus latifolia* cv. Tahiti) seedlings, previously grown in a greenhouse. The  
110 leaves were inoculated using the infiltration method against the abaxial surface. The  
111 concentrations of the bacterial suspensions were adjusted to 10<sup>5</sup> CFU/ml using a  
112 spectrophotometer (Analyzer 500M, São Paulo, Brazil) (Venière et al. 1998). The inoculation  
113 was performed on six points of a leaf blade by infiltration of 100 µl of the suspensions with the  
114 aid of a needleless hypodermic syringe. Leaves inoculated with sterile distilled water (SDW)  
115 alone comprised the negative control. The experimente was completely randomized, with four  
116 replicates. Each replicate comprised three inoculation points of the leaf inoculated. Each leaf  
117 was inoculated on six points, generating two replicates per leaf. After the inoculations, the  
118 seedlings were incubated in a greenhouse and evaluated daily for 12 days to determine the  
119 incubation period, which is the number of days from inoculation until the first symptoms.  
120 Disease severity was evaluated 12 days after inoculation, estimating the extent of damage in  
121 diametrically opposite directions.

122 The population sizes in leaf lesions were estimated 13 days after inoculation for strains  
123 CCRMXC09, CCRMXC15, CCRMXC35, CCRMXC69, CCRMXC122, and CCRMXC130,  
124 according to Gama et al. (2018). These strains were previously characterized and identified by  
125 multilocus sequence analysis (MLSA) as *X. citri* subsp *citri* by Amancio (2022). Four-leaf  
126 fragments (1 cm<sup>2</sup>) were excised from the leaf blade, surface-sterilized and individually  
127 homogenized in 2 ml of SDW. Aliquots of the homogenized suspensions and of 10-fold  
128 dilutions obtained from the suspensions were plated on NYDA media. Bacterial population  
129 sizes were based on enumeration of isolates colonies. The experiment was completely  
130 randomized with four replicates such that each replicate comprised a leaf lesion per strain. To  
131 confirm the identity of the strains recovered and quantified in the study of population size per  
132 lesion, the genomic DNA was extracted based method used to Gama et al. (2018) and  
133 posteriorly performed rep-PCR (REP, ERIC, and BOX-PCR) analyses (Gama et al. 2018) to  
134 compare the profiles as the strains used for inoculations.

135 The assumptions of the analysis of variance were verified by Shapiro-Wilk and Levene  
136 tests using the Statistix 9 software (Tallahassee, FL). The means obtained of the disease severity  
137 were compared by the Scott-Knott test ( $P < 0.05$ ) using the SAEG program version 9.0 (Federal  
138 University of Vic, osa-UFV, Vic, osa, Minas Gerais, Brazil) and the least significant difference  
139 was used to compare the means obtained on population sizes in leaf lesions using the Statistix  
140 9 program.

141 Regarding the sensitivity study to different copper sources, the strains showed a  
142 different sensitivity response to copper oxychloride and copper hydroxide. On NYDA culture  
143 medium, strains of *Xcc* grew up to 100 mg/liter and 200 mg/liter of copper oxychloride and  
144 copper hydroxide respectively, and no growth was observed at concentrations higher than these  
145 (Fig. 1). The quantitative analysis of copper sensitivity of *Xcc* allowed to identify greater  
146 sensitivity to copper oxychloride than copper hydroxide. However, for each copper source, it  
147 was impossible to observe different phenotypic reactions among the tested strains. These results  
148 indicate that all strains have the same sensitivity to these copper sources.

149 Molecular analyzes revealed that no copper resistance genes from the *CopAB* cluster  
150 were detected for the strains tested in this study. However, PCR product (650 pb) were observed  
151 for the *copL* gene to all strains (Fig. 2). These gene clusters were described as essential for the  
152 expression of the copper resistance phenotype in several species of phytopathogenic bacteria,  
153 such as *P. syringae* pv. *tomato*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans*, *X. gardneri* (Behlau et al. 2013),  
154 *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Basim et al. 2005; Voloudakis et al. 2005), *X. campestris* pv.  
155 *juglandis* (Behlau et al. 2013; Lee et al. 1994), *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* (Behlau et al.,  
156 2011) and *Xcc* (Behlau et al. 2011, 2017a; Richard et al. 2017). Previous findings indicate that  
157 *CopLAB* cluster genes are essential for copper resistance in *Xcc* (Behlau et al. 2011), involved  
158 in the sequestration and accumulations of copper (Cooksey 1990; Voloudakis et al. 2005). In  
159 our research, only the presence of the *CopL* gene was detected among the 13 strains studied.  
160 However, previous studies indicate that the *CopL* gene alone is insufficient to confer copper  
161 resistance, being involved only in the expression of *copA* and *copB* genes (Behlau et al. 2011).

162 Our results reinforce the hypothesis that in Northeast Brazil there is a population of *Xcc*  
163 strains that is homogeneous in terms of copper sensitivity. This was confirmed in this study  
164 through *in vitro* sensitivity tests and molecular analyses. Based on the data rep-PCR technique,  
165 using REP, ERIC, and BOX-PCR, Amancio (2022) suggested a genetic homogeneity among  
166 the strains present in the Northeast region, and these findings may explain the similarities  
167 observed in our results, demonstrated through sensitivity test copper-based bactericides and  
168 detection of genes involved with copper resistance. In addition, it is known that citrus canker

169 was introduced in the Northeast of Brazil in the last 10 years (Behlau et al. 2020), indicating  
170 low exposure time of the strains found in this region to copper-based bactericide.

171 To gain insights into the host range, we inoculated strains of *Xcc* (Table 1) on different  
172 plant species. All of the strains used in this study were able to cause damage to the leaves of  
173 mastic, cashew, hog plum, mango, and lime (Fig. 3). However, no significant ( $P < 0.05$ )  
174 differences were observed regarding the severity of symptoms by the Scott-Knott test in these  
175 plants (Table 2). In cashew, the maximum lesion size was produced by CCRMXC18, with 24.4  
176 mm<sup>2</sup>, while the minimum lesion size was recorded in CCRMXC09, with 10.1 mm<sup>2</sup>. In mastic  
177 and mango the maximum lesion size was produced by CCRMXC122 and CCRMXC60, with  
178 20.1 mm<sup>2</sup> and 17.1 mm<sup>2</sup> respectively, while the minimum lesion size was recorded in  
179 CCRMXC130, with 8.3 mm<sup>2</sup> and 11.7 mm<sup>2</sup> respectively. In lime all of the strains were able to  
180 cause typical symptoms of citrus canker, with watersoaking regions followed by erumpent with  
181 margins surrounded by yellow haloes, which caused lesions ranging from 16 to 41 mm<sup>2</sup>, as  
182 expected. However, no damage was observed on grapevine leaves, while in hog plum, the  
183 leaves showed discreet watersoaking regions 3 days after inoculation (dai), without progression  
184 of symptoms. Anyway, in both cases, the severity was considered null in both.

185 In cashew and mango, the incubation period was 3 dai. These spots progressed into  
186 dark lesions on both sides of the leaf, remaining of this way until the end of the experiment.  
187 Interestingly, we observed a slight yellow halo around the lesions on mango leaves. In mastic,  
188 the incubation period was 36 h, and the symptoms observed consisted of irregularly shaped  
189 brown spots. In lime, the first symptoms were observed 4 dai.

190 Statistic differences ( $P < 0.05$ ) were observed among the population density of the  
191 strains of *Xcc* in the different plant species 13 dai (Table 3). In cashew, the population density  
192 per lesion of the strains of *Xcc* ranged from 0,7 to 2,9 x 10<sup>4</sup> CFU/lesion, while in mastic and  
193 mango, the population density per lesion ranged from 2.4 to 9.0 x 10<sup>4</sup> and 0.2 to 0.7 x 10<sup>4</sup>  
194 CFU/lesion, respectively. The population density of these strains was significantly larger per  
195 lesion when inoculated on lime (283 to 380 x 10<sup>4</sup> CFU/lesion) (Table 3). On the other hand, on  
196 hog plum and grape no strain tested was recovered of leaf inoculated, suggesting that apparently  
197 there was no infection of this plant by *Xcc*.

198 To finish, the genomic DNA of the strains CCRMXC15, CCRMXC35, CCRMXC69,  
199 CCRMXC122, and CCRMXC130 reisolated from mastic, cashew, and mango used in the study  
200 of cross-inoculation showed the same REP, ERIC, and BOX-PCR profiles as the strains used  
201 for inoculations, confirming the identity of the strains inoculated and fulfill Koch's postulates  
202 (Fig. 4)

203 Our results of cross-inoculation experiments showed that *Xcc* can survive when  
 204 inoculated artificially on leaves of cashew, mastic, and mango. This was confirmed in this study  
 205 through a pathogenicity test followed by an estimate of population density per lesion. This  
 206 information is important for designing strategies to control citrus canker disease since, in an  
 207 eradication program, it is important to identify all prospective hosts of the target pest or  
 208 pathogen. In 1997, Kalita et al. (1997) reported that goat weed *A. conyzoides*, a plant commonly  
 209 found in citrus orchards in India, serves as a host of *Xcc*. Until now, only the weed *A. conyzoides*  
 210 was reported as non-rutaceous natural host of *Xcc*.

211 In the present study, it was possible to recover strains of *Xcc* from plants belonging to  
 212 the Anacardiaceae family, suggesting an apparent infection of these plants. However, the  
 213 population density of *Xcc* per lesion in these hosts was significantly reduced when compared  
 214 to the population density of *Xcc* on lime per lesion, suggesting a lower capability of bacteria to  
 215 multiply during colonization. However, our results showed that *Xcc* can survive for more than  
 216 10 days on mastic, cashew, and mango, and even at low population density, it may serve as a  
 217 source of primary inoculum for new infections if these plants are found near to citrus orchards.

218 Based on our data, we conclude that there are no Cu<sup>R</sup> strains in our collection, suggesting  
 219 a homogeneous population in terms of sensitivity to copper-based products. Furthermore, we  
 220 describe the first report of *Xcc* surviving on mastic, cashew, and mango in Brazil and  
 221 worldwide. This information may be useful to designing strategies to control citrus canker.

222

## 223 **References**

224 Amancio LCS, Baia ADB, Souza EB, Júnior RS, Negreiros AMP, Balbino VQ, Gama MAS  
 225 (2021) First report of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* causing citrus canker on Lime in Rio  
 226 Grande do Norte, Brazil. *Plant Disease* 105: 4148

227 Basim H, Minsavage GV, Stall RE, Wang J, Shanker S, Jones JB (2005) Characterization of a  
 228 unique chromosomal copper resistance gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv  
 229 *vesicatoria*. *Applied and environmental microbiology* 71:8284-8291

230

231 Behlau F (2021) An overview of citrus canker in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 46: 1 12

232

233 Behlau F, Canteros BI, Minsavage GV, Jones JB, Graham JH (2011) Molecular characterization  
 234 of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* subsp *citri* and *Xanthomonas alfafae* subsp  
 235 *citrumelonis*. *Applied and environmental microbiology* 77: 4089-4096

236

237 Behlau F, Gochez AM, Lugo AJ, Elibox W, Minsavage GV, Potnis N, White FF, Ebrahim M,  
 238 Jones JB, Ramsabhag A (2017a) Characterization of a unique copper resistance gene cluster in  
 239 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolated in Trinidad West Indies *European journal of*  
 240 *plant pathology* 147, 671–681

241

- 242 Behlau F, Graham JH, Jones JB (2012) Copper resistance genes from diferente xanthomonads  
 243 and citrus epiphytic bacteria confer resistance to *Xanthomonas citri* subsp *citri*. European  
 244 Journal of Plant Pathology 133:949-963  
 245
- 246 Behlau F, Hong JC, Jones JB, Graham JH (2013) Evidence for acquisition of copper resistance  
 247 genes from different sources in citrus-associated *Xanthomonas*. Phytopathology 103:409-418  
 248
- 249 Behlau F, Scandelai LHM, Silva Junior GJ, Lanza FE (2017b) Soluble and insoluble copper  
 250 formulations and metallic copper rate for control of citrus canker on sweet Orange trees. Crop  
 251 Protection 94:185-191  
 252
- 253 Canteros BI (1999) Copper resistance in *Xanthomonas campestris* pv *citri*. In: Mahadevan A  
 254 (ed) Plant pathogenic bacteria Proceedings of the International Society of Bacteriology Centre  
 255 for Advanced Study in Botany, University of Madras, Chennai, pp 455–459  
 256
- 257 Cooksey, DA (1990) Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. Annual  
 258 review of phytopathology 28:201-219  
 259
- 260 Cooksey, DA (1993) Copper uptake and resistance in bacteria. Molecular microbiology 7:1-5  
 261
- 262 Dye, DW (1958) Host specificity in *Xanthomonas* Nature 182: 1813-1814  
 263
- 264 Ferraz HGM, Badel JL, da Silva Guimarães LM, Reis BP, Tótola MR, Gonçalves RC, Alfenas  
 265 AC (2018) *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalyptorum* pv. nov causing bacterial leaf blight on  
 266 eucalypt in Brazil. The plant pathology journal 34: 269  
 267
- 268 Gama MAS, Mariano RLR, Júnior WJ, Farias ARG, Barbosa MAG, Ferreira MASV, Júnior  
 269 CRLC, Santos LA, Souza B (2018) Taxonomic repositioning of *Xanthomonas campestris* pv.  
 270 *viticola* (Nayudu 1972) dye 1978 as *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Nayudu 1972) dye 1978  
 271 comb nov and emendation of the description of *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* to include  
 272 pigmented isolates pathogenic to cashew plant. Phytopathology v 108: 1143-1153  
 273
- 274 Gama MAS, Mariano RLR, Viana FMP, Ferreira MASV, Souza EB (2011) Polyphasic  
 275 characterization of pigmented isolates of *Xanthomonas* pathogenic to cashew trees. Plant  
 276 Disease 95:793-802  
 277
- 278 Gottwald TR, Graham JH, Schubert TS (2002) Citrus canker: the pathogen and its impact. Plant  
 279 health progress 3: 15  
 280
- 281 Graham JH, Brooks C, Yonce HD (2016) Importance of early season copper sprays for  
 282 protection of Hamlin orange fruit against citrus canker infection and premature fruit drop.  
 283 Proceedings of the Florida State Horticultural Society 129: 74-78  
 284
- 285 Kalita P, Bora LC, Bhagabati KN (1997) Goat weed - a host of citrus canker (*Xanthomonas*  
 286 *campestris* pv. *citri*). Journal of Mycology and Plant Pathology 27: 96-97.  
 287
- 288 Lee YA, Hendson M, Panopoulos NJ, Schroth MN (1994) Molecular cloning, chromosomal  
 289 mapping, and sequence analysis of copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* pv  
 290 *juglandis*: Homology with small blue copper proteins and multicopper oxidase. Journal of  
 291 bacteriology 176:173-188  
 292

- 293 Leyns F, De Cleene M, Swings JG, De Ley J (1984) The host range of the genus  
294 *Xanthomonas*. The Botanical Review 50: 308-356  
295
- 296 Marin TGS, Galvanin AL, Lanza, FE, Behlau F (2019) Description of copper tolerant  
297 *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and genotypic comparison with sensitive and resistant  
298 strains Plant Pathology 68: 1088-1098  
299
- 300 Menkissoglu O, Lindow SE (1991) Chemical forms of copper on leaves in relation to the  
301 bactericidal activity of cupric hydroxide deposits on plants. Phytopathology 81:1263- 1270  
302
- 303 Richard D, Boyer C, Vernière C, Canteros BI, Lefeuvre P, Pruvost O (2017a) Complete genome  
304 sequences of six copper-resistant *Xanthomonas citri* pv. *citri* strains causing Asiatic citrus  
305 canker, obtained using long-read technology. Genome Announcements 5: e00010–e00017  
306
- 307 Richard D, Ravigné V, Rieux A, Facon B, Boyer C, Boyer K, Grygiel P, Javegny S, Terville  
308 M, Canteros BI, Robène I, Vernière C, Chabirand A, Pruvost O, Lefeuvre P (2017b) Adaptation  
309 of genetically monomorphic bacteria: evolution of copper resistance through multiple  
310 horizontal gene transfers of complex and versatile mobile genetic elements. Molecular Ecology  
311 26:2131-2149  
312
- 313 Scapin MS, Behlau F, Scandelai LHM, Fernandes RS, Silva Junior GJ, Ramos HH (2015) Tree-  
314 row-volume-based sprays of copper bactericide for control of citrus canker. Crop Protection  
315 77:119-126  
316
- 317 Vernière C, Hartung JS, Pruvost OP, Civerolo EL, Alvarez AM, Maestri P, Luisetti J (1998)  
318 Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from  
319 Southwest Asia European Journal of Plant Pathology 104: 477-487  
320
- 321 Voloudakis AE, Reignier TM, Cooksey DA (2005) Regulation of resistance to copper in  
322 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. Applied and environmental microbiology 71:782-  
323 789  
324

**Table 1.** Description of the *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strains used in this study that were originally obtained in different states/areas from northeastern Brazil.

Strains <sup>x</sup>	City/state	Host <sup>y</sup>
CCRMXC09	Mossoró - RN <sup>y</sup>	<i>Citrus aurantifolia</i>
CCRMXC15	Mossoró - RN	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC18	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC35	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC43	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC50	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC60	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC69	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC84	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC90	Limoeiro do Norte - CE	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC112.2	Teresina - PI	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC122	Teresina - PI	<i>C. aurantifolia</i>
CCRMXC130	Teresina - PI	<i>Citrus sinensis</i>

<sup>x</sup>CCRM: isolates from the Laboratory of Phytobacteriology (LAFIBAC) Culture Collection of Federal Rural University of Pernambuco-UFRPE (Pernambuco, Brazil).

<sup>y</sup>RN = Rio Grande do Norte state, CE = Ceará State, PI = Piauí state.



Table 2. Severity of strains of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* inoculated on cashew, mastic, mango, and lime 12 days after inoculation

Strains <sup>w</sup>	Severity (mm <sup>2</sup> ) <sup>v</sup>			
	<i>Schinus terebinthifolia</i>	<i>Anacardium occidentale</i>	<i>Mangifera indica</i>	<i>Citrus latifolia</i>
CCRMXC09	19.15 a <sup>x,y</sup>	10.14 a	15.96 a	16.05 a
CCRMXC15	12.14 a	18.57 a	14.61 a	42.81 a
CCRMXC18	18.96 a	24.45 a	12.41 a	17.54 a
CCRMXC35	12.52 a	22.18 a	9.92 a	29.38 a
CCRMXC43	8.76 a	15.42 a	10.93 a	29.66 a
CCRMXC50	16.54 a	16.02 a	16.82 a	24.44 a
CCRMXC60	10.97 a	16.74 a	17.10 a	33.18 a
CCRMXC69	9.72 a	17.60 a	15.40 a	34.20 a
CCRMXC84	11.90 a	15.20 a	12.73 a	41.05 a
CCRMXC90	13.62 a	17.90 a	18.25 a	19.12 a
CCRMXC112.2	14.59 a	14.28 a	12.43 a	24.29 a
CCRMXC122	20.19 a	20.69 a	12.43 a	29.98 a
CCRMXC130	8.36 a	16.01 a	11.71 a	26.26 a
CV (%) <sup>z</sup>	20,7	18,92	11,75	13.87

<sup>v</sup> Severity: evaluated by measuring the damage at 12 days after inoculation.

<sup>w</sup> CCRM: isolates from the Laboratory of Phytobacteriology (LAFIBAC) Culture Collection of Federal Rural University of Pernambuco-UFRPE (Pernambuco, Brazil).

<sup>x</sup> Mean of four replicates. Means followed by the same letter in the column did not exhibit significant differences by the Scott-Knott test ( $P < 0.05$ ).

<sup>y</sup> Data transformed into  $\text{Log } x + 0.5$ .

<sup>z</sup> CV: coefficient of variation.

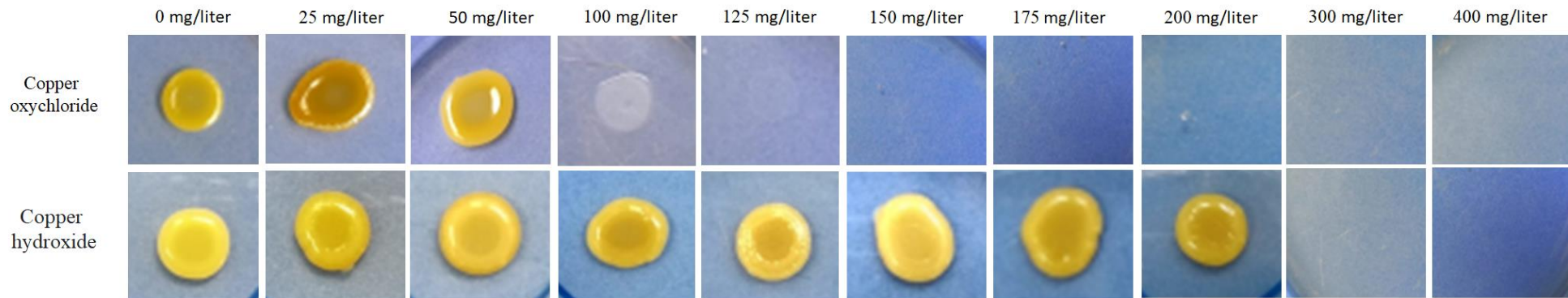
**Table 3.** Population density recorded from leaf lesions 13 days after inoculation with *Xanthomonas citri* subsp. *citri* on cashew, mastic, mango, and lime

Isolate <sup>x</sup>	Colony forming unit (CFU)/ lesion (CFU X 10 <sup>4</sup> )			
	<i>Anacardium occidentale</i>	<i>Schinus terebinthifolia</i>	<i>Mangifera indica</i>	<i>Citrus latifolia</i>
CCRMXC09	2.3 ab <sup>y</sup>	9.0 a	0.4 b	283 b
CCRMXC15	0.7 c	2.7 d	0.2 b	323 ab
CCRMXC35	2.0 b	8.1 b	0.3 b	257 b
CCRMXC69	2.9 a	6.1 c	0.2 b	377 a
CCRMXC122	1.8 b	2.4 d	0.7 a	376 a
CCRMXC130	2.4 ab	2.8 d	0.2 b	380 a
C.V (%) <sup>z</sup>	21.6	10.23	29.68	18.4

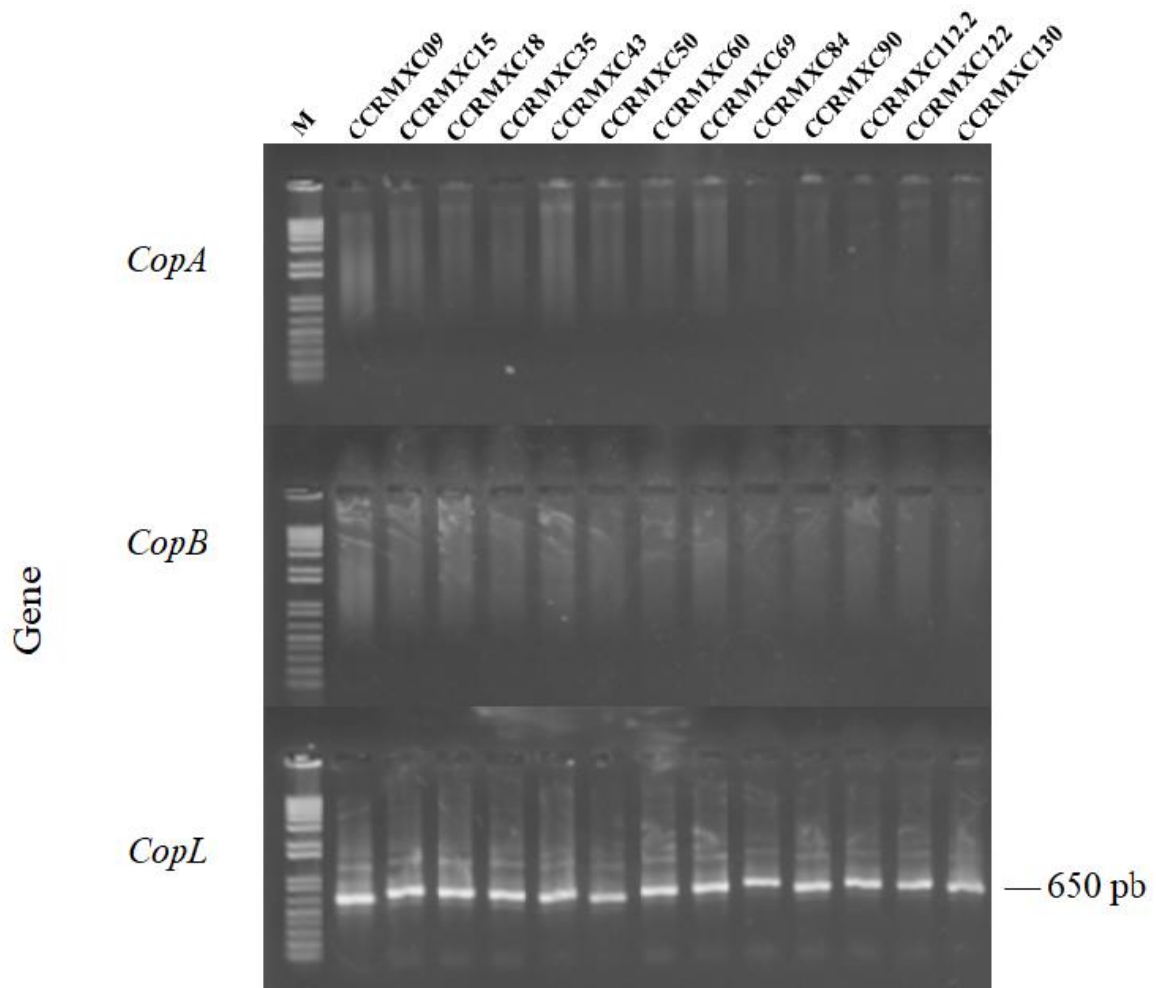
<sup>x</sup>CCRM: isolates from the Laboratory of Phytobacteriology (LAFIBAC) Culture Collection of Federal Rural University of Pernambuco-UFRPE (Pernambuco, Brazil).

<sup>y</sup>Mean of four replicates. Means followed by the same letter in the column did not exhibit significant differences by the least significant difference test ( $P \leq 0.05$ ).

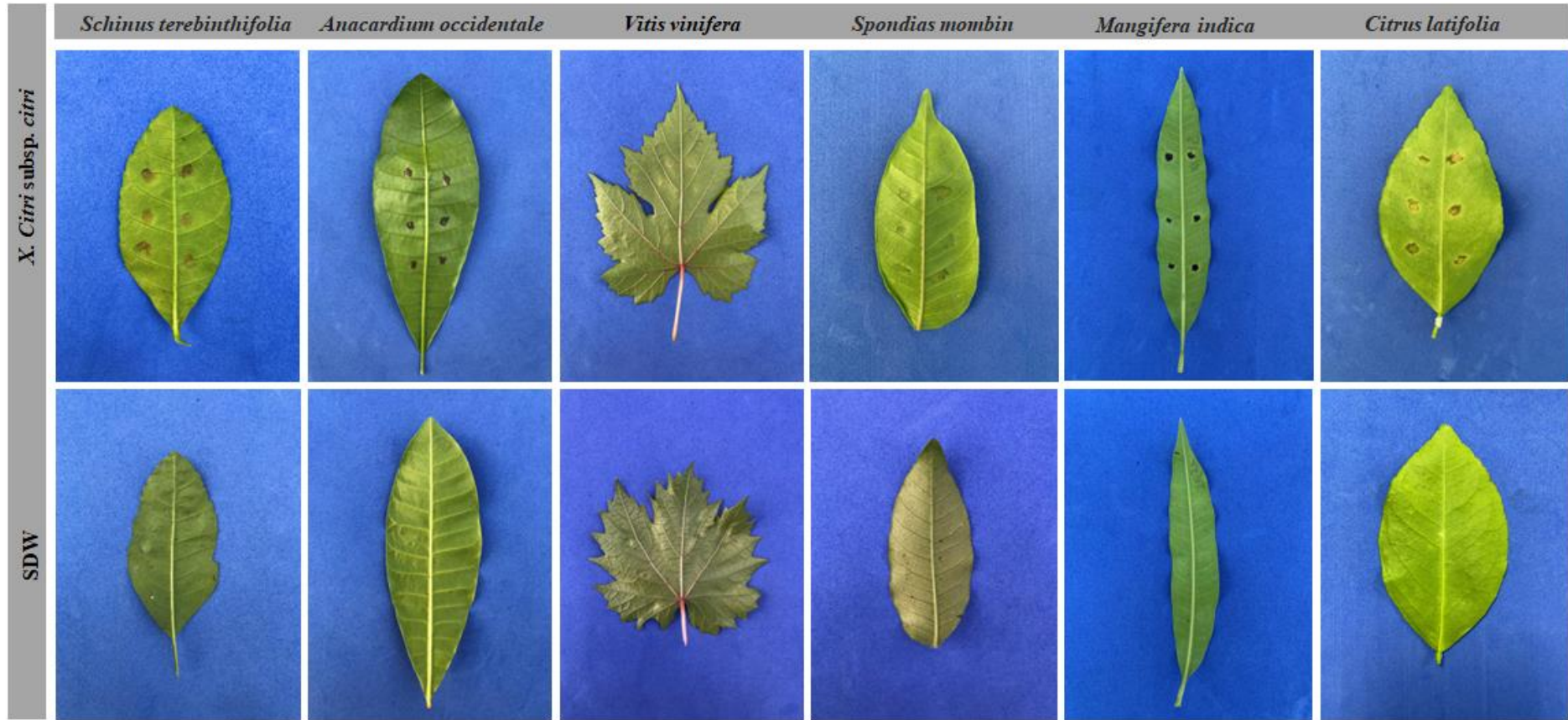
<sup>z</sup>CV: coefficient of variation.



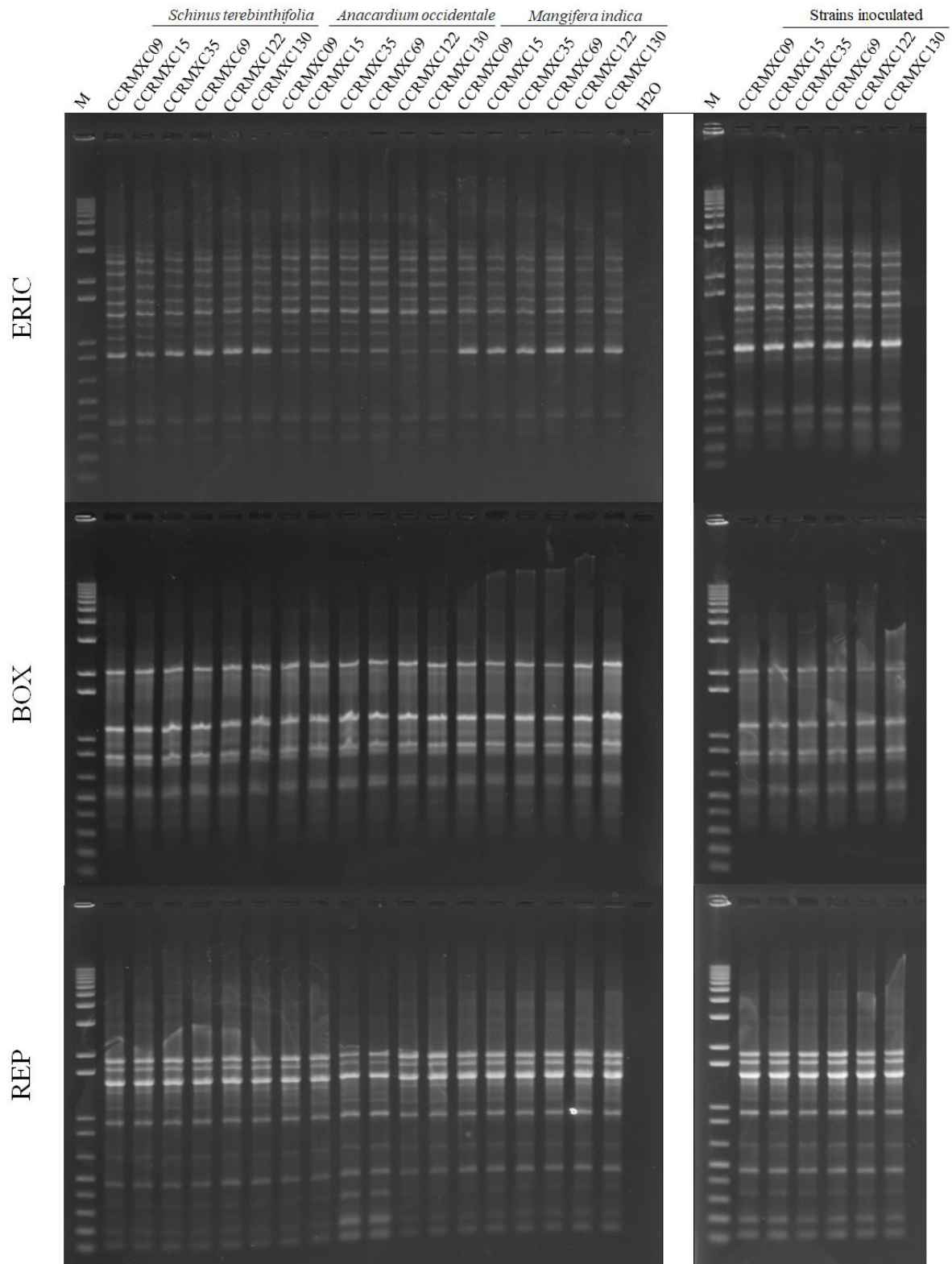
**Fig 1.** Sensitivity of *Xanthomonas citri* subsp *citri* isolates to copper. Nutrient-yeast extract-dextrose-agar (NYDA) medium supplemented with different concentrations of products



**Fig 2.** Amplification by PCR of the *CopLAB* cluster genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strains from northeastern Brazil. MM, molecular marker 1 kbp Plus (Invitrogen). Number on the right indicates the size of the fragment in base pairs (bp).



**Figure 3.** Cross-inoculation of isolates of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* on mastic, cashew, grape, hog plum, mango, and lime using artificial inoculation by infiltration.



**Fig 4.** Comparison of profiles obtained by rep-PCR (REP, ERIC, BOX) of the *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strains inoculated and recovered 13 days after inoculation on mastic, cashew, and mango in the study of cross-inoculation.

## **Conclusões Gerais**

---

---

## CONCLUSÕES GERAIS

- Foi realizado o primeiro registro da ocorrência de cancro cítrico causado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em *Citrus aurantifolia* no estado no Rio Grande do Norte;
- Os 143 isolados obtidos de plantas de citros com sintomas de cancro no Nordeste do Brasil foram identificados como *X. citri* subsp. *citri*, utilizando técnicas de rep-PCR e MLSA;
- A utilização da técnica de MLSA confirmou que o cancro cítrico está presente nos estados do Piauí e Ceará;
- Isolados obtidos em diferentes Estados do Nordeste brasileiro pertencem ao patótipo A, capazes de causar sintomas típicos de cancro em *Citrus sinenses*, *C. aurantifolia* e *Citrus paradisi*, não havendo a presença de isolados pertencentes aos subtipos A\* e A<sup>W</sup> de *X. citri* subsp. *citri* em nossa coleção;
- A utilização das técnicas de rep-PCR e MLSA confirmaram que a população de isolados de *Xanthomonas* obtidos de *C. aurantifolia* e *C. sinensis* apresentam baixa variabilidade genética, sugerindo uma origem em comum na introdução do cancro cítrico no Nordeste do Brasil;
- A utilização do sistema Biolog® confirmou que isolados de *X. citri* subsp. *citri* obtidos nesse estudo apresentam baixa variabilidade bioquímica;
- Isolados de *X. citri* subsp. *citri* apresentaram comportamento similar quanto a sensibilidade a hidróxido de cobre e oxicloreto de cobre;
- Os genes *CopA* e *CopB* não estão presentes nos isolados estudados, o que indica ausência de isolados resistentes ao cobre;
- O gene *CopL* está presente em todos os isolados estudados e ao que parece não confere sozinho resistência a cobre;



- Foi realizado o primeiro registro da infecção por *X. citri* subsp. *citri* em *Mangifera indica*, *Anacardium occidentale* e *Schinus terebinthifolia*, ao que indica serem hospedeiras desta bactéria