

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

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE
“*Candidatus Liberibacter asiaticus*” DETERMINADA POR
MARCADORES SSR**

Larissa Bonevaes de Paula

Bióloga

2015

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

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE
“*Candidatus Liberibacter asiaticus*” DETERMINADA POR
MARCADORES SSR**

Larissa Bonevaes de Paula

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Sanches Stuchi

Co-orientador: Dr. Helvécio Della Coletta Filho

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de plantas).

2015

Bonevaes, Larissa de Paula
B712d Diversidade genética em populações de “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” determinada por marcadores SSR / Larissa Bonevaes de Paula. – – Jaboticabal, 2015
xi, 49 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientador: Eduardo Sanches Stuchi
Co-orientador: Helvécio Della Coletta Filho
Banca examinadora: Janete Aparecida Desidério, José Belasque Júnior
Bibliografia

1. “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”. 2. Genética de Populações.
3. Huanglongbing. 4. Marcadores SSR. I. Título. II. Jaboticabal -
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:634.31

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


**TÍTULO: “DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE
"Candidatus Liberibacter asiaticus" DETERMINADA POR
MARCADORES SSR”**

AUTORA: LARISSA BONEVAES DE PAULA

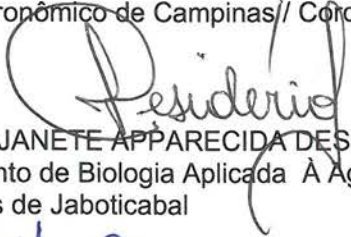
ORIENTADOR: Prof. Dr. EDUARDO SANCHES STUCHI

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. HELVÉCIO DELLA COLETTA FILHO

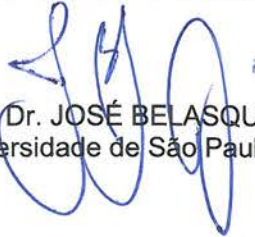
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS) , pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. HELVÉCIO DELLA COLETTA FILHO
Instituto Agronômico de Campinas/ / Cordeirópolis/SP



Profa. Dra. JANETE APPARECIDA DESIDERIO
Departamento de Biologia Aplicada À Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. JOSÉ BELASQUE JÚNIOR
Universidade de São Paulo / Piracicaba/SP

Data da realização: 28 de agosto de 2015.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Larissa Bonevaes de Paula, nascida em 19 de junho de 1989, em Guará, SP. Filha de Selma Regina Bonevaes de Paula e Arioaldo Matos de Paula. Iniciou sua graduação em Ciências Biológicas no Centro de Ensino Superior de Uberaba (CESUBE), em Uberaba, MG, em 2007. Foi estagiária remunerada no Laboratório de Biotecnologia (Cultura de Tecidos Vegetais) da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), em Uberaba, no ano de 2008. Em 2009, por processo seletivo de transferência, continuou a sua graduação na Universidade Federal de Uberlândia (UFU), em Uberlândia. Foi estagiária voluntária no Laboratório de Morfologia Vegetal, Microscopia e Imagens desta instituição, entre 2009 e 2011, onde desenvolveu um projeto de comparação morfoanatômica entre duas espécies de *Microlícia* (Melastomataceae), do Parque Nacional da Serra da Canastra. Neste mesmo período, foi bolsista CAPES no Subprojeto Biologia do Programa Institucional de Bolsa de Iniciação à Docência (PIBID/UFU). Após o término do período de atuação no PIBID, foi bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica PIBIC/FAPEMIG/UFU, no laboratório de Genética da UFU, onde desenvolveu um projeto de pesquisa com discos foliares de *Ricinus communis*, até Fevereiro de 2012. De março a julho de 2012, foi bolsista PIBIC/CNPq/UFU, no laboratório de Genética da UFU, onde continuou o trabalho com *Ricinus communis*, desenvolvendo um projeto com sementes e exsudatos de sementes de *Ricinus communis*. Em abril de 2013, defendeu sua monografia, com o trabalho de comparação morfoanatômica entre duas espécies de *Microlícia*, assim concluindo sua graduação. Em agosto de 2013, ingressou como aluna regular no curso de Mestrado do programa de Pós-graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) de Jaboticabal, na qual foi contemplada com bolsa do programa – CAPES. Seu trabalho de dissertação foi desenvolvido no Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” do Instituto Agrônomo, em Cordeirópolis, com o estudo de diversidade genética da bactéria “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”.

“Nothing is IMPOSSIBLE, the word itself says: I’M POSSIBLE!”

(Audrey Hepburn)

Aos meus pais Ariovaldo e Selma, meu irmão Leandro e minha avó e madrinha Lourdes, que compartilharam do meu sonho, o meu sincero agradecimento pelo grande incentivo, apoio e confiança.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora, por sempre me guiarem na caminhada da vida.

Aos meus pais, Ariovaldo e Selma, pelo amor incondicional.

Ao meu irmão, Leandro, por ser um exemplo de pessoa dedicada ao que gosta de fazer.

Aos meus familiares, principalmente a avó e madrinha Lourdes e a tia Roseli, que torcem pela minha vitória.

Às amigas antigas, que fortaleceram nos últimos tempos e às novas amigas, que chegaram para ficar.

Aos pesquisadores Dr. Eduardo Sanches Stuchi e Dr. Helvécio Della Coletta Filho, pela orientação.

À UNESP – Jaboticabal, e todos os seus membros, que possibilitaram a realização do meu Mestrado.

À cidade de Jaboticabal, por ter me acolhido muito bem.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” do IAC, em Cordeirópolis, e seus membros, que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho, dando todo o suporte necessário. E, aos colegas, com os quais convivi durante minha estadia no Centro.

Aos membros da comissão examinadora Dra. Janete Aparecida Desidério e Dr. José Belasque Júnior, pela colaboração para o aperfeiçoamento do trabalho.

E, a todos que de forma direta ou indireta, colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

Meu muito obrigada!

SUMÁRIO

	Páginas
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Huanglongbing (HLB) ou greening.....	3
2.2. Agentes causais: “ <i>Candidatus Liberibacter spp.</i> ”.....	5
2.3. “ <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> ” – diversidade genética.....	6
2.4. As plantas de citros como hospedeiras de “ <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> ”.....	10
2.5. Ferramentas para estudos de diversidade genética.....	11
3. OBJETIVOS	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1. Locais de amostragem.....	13
4.2. Extração de DNA.....	17
4.3. Padronização da PCR.....	17
4.4. Eletroforese de capilar.....	18
4.5. Sequenciamento dos amplicons gerados com os iniciadores SSR.....	20
4.6. Análises estatísticas dos marcadores SSR.....	22
a) Diversidade clonal.....	22
b) Diversidade genética.....	22
c) Diferenciação entre populações.....	22
4.7. PCR <i>in silico</i> e análises das sequências obtidas dos amplicons SSR.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1. Marcadores SSR: padronização, amplificação e frequência alélica nas populações de Las	23
5.2. Diversidade genética e genotípica.....	26
5.3. Diferenciação genética entre as subpopulações.....	28
5.4. PCR <i>in silico</i> e análises das sequências obtidas dos amplicons SSR.....	34
6. CONCLUSÕES	37
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” DETERMINADA POR MARCADORES SSR

RESUMO – Huanglongbing (HLB) doença dos citros emergiu como a principal ameaça à produção de citros no mundo, associado com a bactéria (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*” – Las) limitada ao floema e ao vetor (*Diaphorina citri*). No Brasil, o HLB foi relatado pela primeira vez em 2004 e rapidamente se espalhou para todas as regiões geográficas do Estado de São Paulo (SPS), Paraná (PR) e Minas Gerais (MG). No entanto, informações sobre a diversidade genética desta bactéria são pouco conhecidas. Aqui nós testamos a hipótese H0: ambas as regiões geográficas diferentes e espécies de citros não moldam a diversidade genética de populações de Las do Brasil. Para comprovar a hipótese, DNA de 199 amostras de plantas cítricas com sintomas de HLB foram amplificadas com 9 conjuntos de iniciadores microssatélites, sendo os iniciadores diretos marcados com corantes fluorescentes. Níveis moderadamente baixos de diversidade genética ($H_{Nei} = 0,11 - 0,26$) foram observados em todas as populações desta bactéria. Com uso da estatística F de Wright (F_{ST}), nenhuma diferença estatística foi observada entre populações de Las de todas as sete subdivisões das regiões geográficas do SPS e de MG ($F_{ST} < 0,095$). Mas, valores significativos de diferenciação entre populações ($F_{ST} = 0,118 - 0,191$) foram obtidos para populações de Las do PR comparado com as do SPS e MG. Também, valores ainda mais altos e significativos ($F_{ST} = 0,275 - 0,445$) foram observados comparando populações de Las em laranjeiras doce do SPS, MG e PR com as populações de diferentes espécies de citros cultivados na região Sudeste do SPS. Por meio de métodos de agrupamento realizados por estatística Bayesiana e de coordenada principal pode-se agrupar todos os isolados estudados em três populações geneticamente distintas: 1. Um grupo contempla todas as estirpes das regiões do SPS mais MG, 2. Um segundo contendo somente as estirpes de Las do PR, 3. E um terceiro onde agrupou-se as estirpes provenientes das espécies de citros. Concluindo, após 10 anos do primeiro relato de HLB no Brasil, que populações geneticamente homogêneas de Las infectando laranja doce estão presentes nas diferentes regiões geográficas amostradas, com exceção das populações obtidas de plantas oriundas do PR e dos diferentes genótipos de citros. Neste último caso não se pode excluir a hipótese de que diferenças genotípicas entre os hospedeiros podem estar modulando a população do patógeno. Do mesmo modo, a hipótese de introduções diferentes no PR e em SPS não pode ser descartada.

Palavras-chave: “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”, genética de populações, huanglongbing, marcadores SSR

GENETIC DIVERSITY IN “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” POPULATIONS DETERMINED BY SSR MARKERS

ABSTRACT – Citrus huanglongbing (HLB) disease emerged as a primary threat for citrus production worldwide, associated with the phloem and vectored (*Diaphorina citri*) limited - bacterium “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” (Las). In Brazil, HLB was first reported in 2004 and quickly spread for all geographic regions of the States of Sao Paulo (SP), Parana (PR) and Minas Gerais (MG). However, information about genetic diversity of this bacterium is poorly known. Here we tested the hypothesis H0: different geographic regions and citrus species have no influence on genetic diversity of Las populations in Brazil. To test this hypothesis, total DNA from 199 samples from citrus plants with symptoms of HLB was amplified by 9 sets of forward-fluorescent microsatellites primers. Moderately low levels of genetic diversity ($H_{Nei} = 0,11$ to $0,26$) were observed through all populations. By Wright’s F_{ST} statistics (F_{ST}), no statistic difference was observed among Las populations from all the seven previously subdivided geographic regions of SP and MG ($F_{ST} < 0,095$). But significant F_{ST} values ($0,118$ to $0,191$) were obtained for Las population from PR compared to SP and MG. On the other hand, highest and significant values for F_{ST} index ($0,275$ to $0,445$) were observed comparing Las populations from sweet orange trees from SP, MG, and PR and the populations from different citrus species grown at the Southeast region of SP. By Bayesian statistics and principal coordinate analysis all isolates studied were clustered in three genetically different populations: 1. a group that includes all strains from SP regions and MG, 2. A second composed only by Las strains from PR, and 3. a third where strains from different citrus species were grouped. In conclusion, after 10 years of the HLB first report in Brazil, that genetically homogeneous populations of Las infecting sweet orange are present at different geographic regions sampled, with the exception of the populations obtained from plants from PR and from different citrus genotypes. For this, the hypothesis of different citrus genotypes shaping the pathogen population couldn’t be excluded. In addition, different introduction of Las in SP and PR could not be discarded.

Key words: “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”, population genetics, huanglongbing, markers SSR

1. INTRODUÇÃO

A citricultura é uma das agroindústrias de maior importância econômica e social no Brasil, reconhecida internacionalmente por ser um setor de destaque na organização e competitividade. O Brasil é responsável por mais da metade da produção mundial de suco de laranja, exporta 98% de toda a produção e possui 85% de participação no mercado mundial. O Estado de São Paulo é o principal produtor e exportador de suco e detém 53% do total da produção mundial, com faturamento anual da ordem de US\$ 1,5 a 2,5 bilhões, com exportações de suco concentrado e subprodutos da laranja (pectina, óleo essencial e ração) (NEVES et al., 2010).

O crescente desenvolvimento desta agroindústria nas últimas décadas, concentrado na área produtiva do cinturão citrícola composto por São Paulo e Triângulo Mineiro, também Sul de Minas Gerais e Noroeste do Paraná, está associado a diversos problemas fitossanitários, com o surgimento de novas pragas e doenças (NEVES et al., 2010).

O Huanglongbing (HLB) ou greening é considerado atualmente a doença de maior potencial de dano, seja pela severidade dos sintomas, rápida disseminação entre plantas e pela falta de resistência genética dentro do gênero *citrus*.

O agente etiológico do HLB é a α proteobactéria "*Candidatus Liberibacter* spp.", uma bactéria Gram-negativa, não cultivável e limitada ao floema da planta hospedeira (COLETTA-FILHO et al., 2004a, b). A doença foi constatada no continente americano, mais precisamente no Brasil, no Estado de São Paulo, em uma propriedade no município de Araraquara, em março de 2004, com a espécie do patógeno "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" (Las) estando associada à doença (COLETTA-FILHO et al., 2004a), e em 2005 foi detectada a espécie "*Candidatus Liberibacter americanus*" (Lam), também em pomares do Estado de São Paulo (TEIXEIRA et al., 2005a).

Após 11 anos de identificação dos agentes causais do HLB em pomares do Estado de São Paulo, Las é a espécie predominante em todas as regiões citrícolas do Estado de São Paulo, Triângulo Mineiro, Sul de Minas Gerais e Noroeste do Estado do Paraná (GOTTWALD, 2010), e também de vários outros países do continente americano: Estados Unidos, México, Belize, Cuba, República Dominicana, entre outros (HALL et al., 2012).

O principal vetor do agente causal do HLB é a espécie de psíldeo *Diaphorina citri* Kuwayama, relatado primeiramente no Brasil no Estado do Rio de Janeiro em 1942 (COSTA LIMA, 1942). Anteriormente classificada como Hemiptera da família Psyllidae (CAPOOR; RAO; VISWANATH, 1974), em estudos recentes foi transferida para a família Liviidae (BURCKHARDT; OUVRARD, 2012). Este inseto permaneceu cerca de 60 anos em pomares do Brasil sem a presença do patógeno, portanto sem causar danos significativos para a citricultura (COSTA LIMA, 1942; BOVÉ, 2006). Atualmente essa espécie de psíldeo está presente em pomares de São Paulo, Rio de Janeiro, Sul do Triângulo Mineiro, Noroeste do Paraná, Bahia, Amazônia, Ceará, Pará e Pernambuco, portanto, sendo uma grande ameaça para os Estados até então livres do HLB (FUNDECITRUS, 2005; ANJOS-DUARTE et al., 2011).

O modelo de manejo adotado para esta doença compreende além do uso de mudas sadias, a erradicação das plantas contaminadas e o controle intenso do vetor, que tem elevado consideravelmente o custo de produção, gerando enormes prejuízos em todos os locais de ocorrência da doença, com significativas perdas econômicas, provocando o abandono da cultura por muitos produtores (GOTTWALD; DA GRAÇA; BASSANEZI, 2007; AGNELLI, 2011; SAUER et al., 2015).

Quando da verificação de uma nova doença, em uma determinada região, faz-se necessário observar a distribuição do agente etiológico e estudar a sua estabilidade genética, para identificar se existem estirpes do patógeno geneticamente e biologicamente distintas provocando a doença no mesmo ambiente. Para isto, avanços nas técnicas de genética molecular têm melhorado substancialmente a capacidade de identificar e caracterizar os fitopatógenos (LOUWS; RADEMARKER; BRUIJN, 1999).

O conhecimento e avaliação da variabilidade genética da bactéria podem fornecer informações importantes sobre a origem do patógeno, traçar rotas epidemiológicas e principalmente, distinguir a composição genética da população através da presença de padrões de estirpes específicos ou predominantes.

Diante do exposto, a hipótese testada neste trabalho, após uma década do primeiro relato do HLB no Brasil, foi:

Dado a recente introdução, não existe variabilidade genética entre as populações de Las presentes em plantas com HLB nas diferentes regiões citrícolas afetadas pela doença (Estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná).

Objetivos

Para verificar se existe variabilidade genética dentro da espécie "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" foram realizados os seguintes experimentos: padronização das amplificações para as regiões SSRs (microsatélites) de Las; amplificação com os iniciadores SSRs isolados de Las presentes em plantas com sintomas de HLB, padronização das corridas de eletroforese de capilar no sistema ABI 3130 DNA Analyzer® (Applied Biosystems) para condições de multiplex e sequenciamento dos produtos da PCR obtidos com os diferentes iniciadores SSR para verificação da reprodutibilidade dos resultados da eletroforese em capilar.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Huanglongbing (HLB) ou greening

O huanglongbing (HLB), do mandarim "doença do ramo amarelo", também conhecido pela denominação Sul-Africana "greening" foi relatado em 1919 na China, tendo atualmente ocorrência descrita em mais de quarenta países no mundo todo (BOVÉ, 2006). No continente americano, a primeira constatação da doença ocorreu no Brasil, na região central do Estado de São Paulo em 2004 (COLETTA-FILHO et al., 2004a).

Dentre as diferentes doenças que atacam os cítricos, o HLB é umas das mais prejudiciais (BOVÉ, 2006; ALBRECHT; BOWMAN, 2011; PEREIRA et al., 2011; ISLAM et al., 2012). Esta doença produz sintomas bastante diversos, sendo que a clorose assimétrica (Figura 1. a) é o sintoma mais característico de plantas cítricas, principalmente em laranjeiras doce, com HLB. Ocorre primeiramente em folhas da extremidade de poucos ramos na copa da planta, onde são observadas folhas com manchas assimétricas de coloração amarela pálida. Outros sintomas associados à doença e que também podem ser observados são deficiências dos minerais zinco (Figura 1. b) e manganês. Em estádios mais avançados da doença as plantas

sintomáticas exibem queda acentuada de folhas e frutos (BOVÉ, 2006; TORRES, 2008; MARENGO, 2009; ANJOS-DUARTE et al., 2011; COERINI, 2014). Em estado avançado da doença os frutos que permanecem na árvore desenvolvem-se assimetricamente, ficando com a columela central torta (Figura 1. c), com a maturação iniciando-se pelo pedúnculo (Figura 1. d). Podem ser observados também nos frutos, vasos com coloração alaranjada e abortamento de sementes. Além dos danos à produção a qualidade organoléptica do suco é comprometida, ficando estes mais ácidos e com menor quantidade de sólidos solúveis (BOVÉ, 2006; BASSANEZI; MONTESINO; STUCHI, 2009; ANJOS-DUARTE et al., 2011).

Devido à dificuldade no manejo e os danos que provoca, o HLB acarreta enormes perdas e coloca em risco a indústria exportadora da *commodity* citros (BELASQUE Jr. et al., 2010; ALBRECHT; COLLUM; BOWMAN, 2012), caso medidas de manejo não sejam adotadas de forma eficaz.

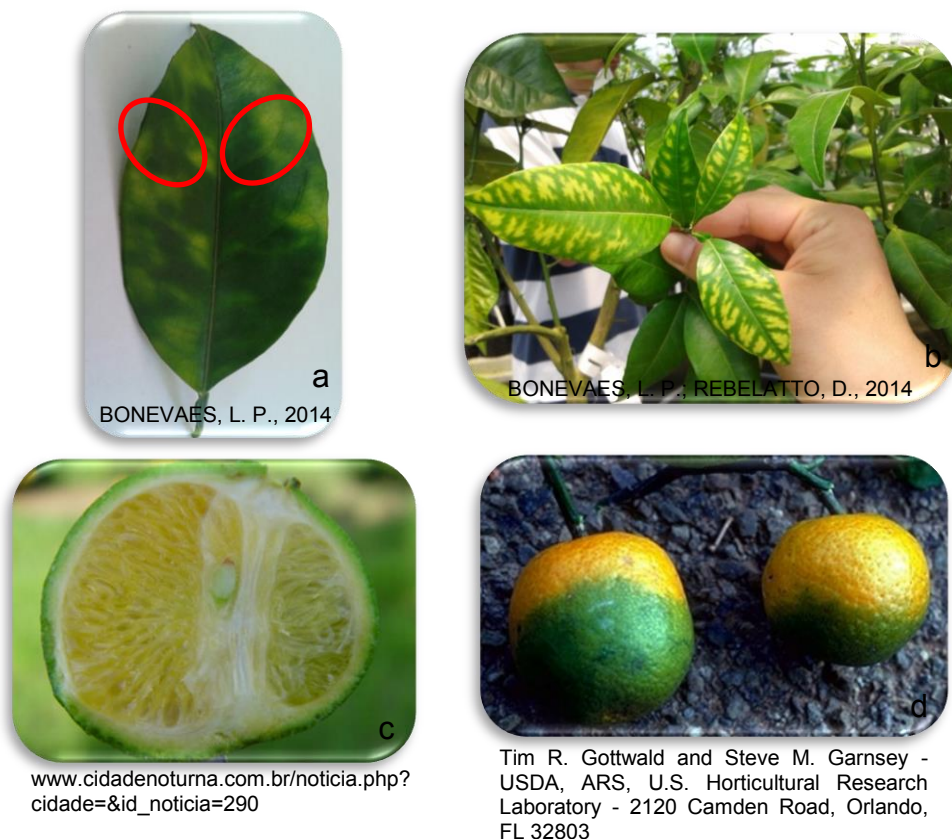


Figura 1. Sintomas associados à doença do Huanglongbing (a: Clorose assimétrica; b: Deficiência de Zinco; c: Frutos assimétricos; d: Frutos com maturação iniciando-se pelo pedúnculo).

2.2. Agentes causais: “*Candidatus Liberibacter spp.*”

Os agentes etiológicos do HLB são bactérias endocelulares, conhecidas como “*Candidatus Liberibacter spp.*”, que habitam o floema da planta hospedeira. O prenome *Candidatus* (*Ca.*) é dado pelo fato de não ser possível o seu cultivo “*in vitro*”, o que dificulta a realização de todos os testes necessários para a classificação taxonômica (MURRAY; SCHLEIFER, 1994; TEIXEIRA et al., 2005b). Por meio da observação estrutural da parede celular e estudos filogenéticos por meio de métodos moleculares com o gene ribossomal 16S (16S rDNA), a bactéria causadora do HLB pode ser classificada como uma α proteobactéria, Gram-negativa, da ordem Rhizobiales e família *Rhizobiaceae* (GARNIER; DANIEL; BOVÉ, 1984; JAGOUEIX; BOVÉ; GARNIER, 1994).

Inicialmente proposta como *Liberobacter* (JAGOUEIX; BOVÉ; GARNIER, 1994), por ser restrita aos vasos liberianos, a bactéria teve o nome do gênero alterado para *Liberibacter* (L.), para ajuste no nome latino correto, portanto, apenas a denominação *Candidatus* deve ser destacada em itálico (MACHADO; LOCALI-FABRIS; COLETTA-FILHO, 2010).

O HLB em citros é provocado por diferentes espécies de “*Ca. Liberibacter*” (BOVÉ, 2006). A denominação seguiu a região geográfica onde a espécie foi primeiramente reportada: “*Ca. L. asiaticus*”, ocorreu inicialmente em países asiáticos, e tem como vetor o psílideo *Diaphorina citri* Kuwayama, sendo a responsável pela forma mais agressiva do HLB (CAPOOR; RAO; VISWANATH, 1967). “*Ca. L. africanus*”, foi encontrada inicialmente em alguns países do continente Africano, sendo o seu vetor o psílideo *Trioza erythrae* (DEL GUERCIO, 1918), responsável pela forma menos agressiva do HLB, quando comparado ao HLB asiático (McCLEAN; OBERHOLZER, 1965). Uma terceira espécie, “*Ca. L. americanus*”, que foi detectada no Brasil, em pomares do Estado de São Paulo, tem como vetor também a *D. citri* (TEIXEIRA et al., 2005a, b). No início da epidemia de HLB no Brasil, especificamente nos pomares do Estado de São Paulo, a espécie americana era predominante (TEIXEIRA et al., 2005a), porém nos dias atuais é mais frequente a presença da espécie “*Ca. L. asiaticus*” (LOPES et al., 2009a, b).

Todas as espécies de *Citrus* e cultivares são susceptíveis à contaminação pelas três espécies de bactérias causadoras do HLB (COLETTA-FILHO et al., 2005;

OLIVEIRA, J., 2012;). Além da transmissão pelo vetor, a bactéria pode ser transmitida por meio de enxertia de tecidos vegetais infectados e também por plantas parasitas do gênero *Cuscuta* (MACHADO; LOCALI-FABRIS; COLETTA-FILHO, 2010).

2.3. “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” – diversidade genética

As três espécies de “*Ca. Liberibacter*” associadas ao HLB são facilmente identificadas por meio de marcadores moleculares, devido a suficiente variabilidade genética que apresentam (COLETTA-FILHO et al., 2004a, b). As espécies, africana (“*Ca. Liberibacter africanus*”) e americana (“*Ca. Liberibacter americanus*”) diferenciam-se da asiática (“*Ca. Liberibacter asiaticus*”) também por características biológicas. As duas primeiras espécies apresentam menor tolerância a altas temperaturas, menor facilidade de transmissão via enxertia e menor capacidade de multiplicação nos tecidos das plantas cítricas quando comparadas a “*Ca. Liberibacter asiaticus*” (GARNIER et al., 1991; DA GRAÇA, 1991; JAGOUEIX; BOVÉ; GARNIER, 1997; LOPES et al., 2009a, b). No trabalho de Lopes et al. (2009a) foi comprovado que “*Ca. L. asiaticus*” é mais tolerante a altas temperaturas ambientais do que “*Ca. L. americanus*”, enquanto *Las* tolera temperaturas acima de 32°C, a população de *Lam* nestas condições pode diminuir consideravelmente, ou até não sobreviver. A espécie africana da bactéria também não suporta altas temperaturas (BOVÉ et al., 1974). “*Ca. L. asiaticus*”, também se diferencia da bactéria “*Ca. L. americanus*”, pela maior facilidade de transmissão via enxertia de tecidos infectados para outros *Citrus* e, pela capacidade de multiplicação nestes tecidos vegetais, com média de dez vezes mais populações bacterianas do que “*Ca. L. americanus*” (LOPES et al., 2009b).

O conhecimento da diversidade genética da bactéria é de extrema importância para estudos taxonômicos, de dinâmica populacional da bactéria em diferentes hospedeiros e ambientes, traçar rotas migratórias do patógeno e desenvolvimento de métodos de diagnóstico molecular (TOMIMURA et al., 2009; MACHADO; LOCALI-FABRIS; COLETTA-FILHO, 2010; CASAIS et al., 2014). Para isto, há algumas regiões importantes no genoma que são bastante usadas, como a proteína ribossomal 16S e os espaçadores intergênicos 16S e 23S (JAGOUEIX; BOVÉ;

GARNIER, 1997, 1994; SUBANDIYAH et al., 2000; COLETTA-FILHO et al., 2005). Outras sequências do genoma da bactéria causadora do huanglongbing, também têm sido usadas para a determinação da sua diversidade, como o gene *omp* que codifica a proteína de membrana Omp (outer membrane protein) (BASTIANEL et al., 2005), o agrupamento gênico *nusG-rpKAJL-rpoB* (OKUDA et al., 2005) e o gene da DNA polimerase de bacteriófago (TOMIMURA et al., 2009). O uso destes genes conservados e variações nos mesmos são suficientes para distinguir espécies, mas limitam os estudos de diversidade de populações dentro da espécie (MACHADO; LOCALI-FABRIS; COLETTA-FILHO, 2010). Coletta-Filho et al. (2005) ao analisarem a sequência 16S rDNA de “*Ca. Liberibacter*” presentes em pomares de São Paulo separaram as bactérias em dois grupos distintos. Um grupo contendo Las foi 100% idêntico aos isolados de Las do Japão e o outro grupo apresentou semelhança genética de 96,1 a 96,3% com o isolado asiático e de 95,8 a 96,1% com o africano, o estudo revelou que pode ter ocorrido INDELS, ou seja, eventos de inserção ou deleção no genoma, ou a presença de mutações pontuais, com mudanças na sequência genômica no segundo grupo. Subandiyah et al. (2000) analisaram além do gene 16S rDNA, também a região intergênica 16S/23S de vários isolados de “*Ca. Liberibacter*” do Japão, Filipinas, Indonésia e Tailândia. As sequências do 16S rDNA foram idênticas em todos os isolados, bem como os espaçadores intergênicos, mas nestes últimos, os isolados apresentaram pouca diferença em comparação aos isolados indianos e chineses, e muita diferença dos isolados africanos. O estudo de Jagoueix, Bové e Garnier (1994) foi realizado para determinar a posição filogenética da bactéria causadora do HLB e a distância evolutiva entre as espécies africana e asiática. A comparação da sequência do gene 16S rDNA das duas espécies revelou que ambas são pertencentes à subdivisão α das proteobactérias. Já no trabalho de Jagoueix, Bové e Garnier (1997) os autores estudaram a região intergênica 16S/23S de dois isolados de “*Ca. Liberibacter asiaticus*” e um de “*Ca. Liberibacter africanus*”, que apresentaram 79,46% de homologia, no entanto entre os dois isolados da mesma espécie foram observados 100% de homologia. Bastianel et al. (2005) estudaram a variabilidade genética de dez isolados de Las, com a sequência do gene *omp* e os separaram em dois grupos distintos de acordo com a origem geográfica. No entanto, apesar da grande semelhança, cada isolado possui um

padrão diferente de RFLP (“restriction fragment length polymorphism”), com exceção de dois isolados da mesma região que foram idênticos e provavelmente compõem um único isolado. Para a análise de RFLP, o total do gene da *omp* de “*Ca. Liberibacter*” foi amplificado com iniciadores selecionados, os produtos foram digeridos com algumas enzimas, e os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2%. Okuda et al. (2005) estudando o agrupamento gênico *nusG-rplKAJL-rpoB* de isolados de “*Ca. Liberibacter*” do Japão e da Indonésia observaram sequências idênticas entre os isolados dos dois países, com exceção de três alterações de nucleotídeos. Tomimura et al. (2009) investigaram a diversidade genética de Las de regiões geográficas do Sudeste asiático, estimada pelo gene de DNA polimerase de bacteriófago, entre outros. A análise filogenética das sequências de DNA polimerase de bacteriófago revelou três grupos na população de Las, os isolados da Indonésia formaram um grupo, e a distribuição geográfica dos outros grupos não foi identificada.

A possibilidade de uso de outros genes para estudos de diversidade dentro da espécie da bactéria surgiu após a publicação da sequência genômica completa de Las (DUAN et al., 2008, 2009; KATOH et al., 2014). Isto permitiu também o uso de marcadores com maior potencial de variabilidade, como os fundamentados em sequências simples repetitivas (SSR) (CHEN et al., 2010; KATOH et al., 2011; ISLAM et al., 2012). Estes trabalhos demonstraram que os marcadores microssatélites SSR foram eficientemente esclarecedores para separar estirpes de “*Ca. L. asiaticus*” geneticamente distintas dentro e entre macrorregiões geográficas. No trabalho de Chen et al. (2010) foi referido um único conjunto de iniciadores como suficiente para o estudo da diversidade de estirpes de Las. Porém, há controvérsias entre alguns autores, que acreditam na insuficiência de um único locus SSR para revelar a diversidade genética de Las com precisão, como citado no trabalho de Katoh et al. (2011). Isto pode ser significativo, devido às bactérias apresentarem como mecanismo de variabilidade genética, a facilidade de mutação espontânea. Portanto, se usado apenas um conjunto de iniciadores, a variabilidade pode ocorrer em outros locus SSR que não o em estudo, sendo desta forma, realmente pouco representativo o estudo de diversidade genética com apenas um locus microssatélite.

Katoh et al. (2011), estudaram o polimorfismo de isolados de Las da mesma região geográfica, usando quatro conjuntos de iniciadores SSR e obtiveram por meio da frequência de alelos, altos índices de diversidade genética (H_{Nei}), que variaram de 0.60 a 0.86. No trabalho de Islam et al. (2012), usaram sete conjuntos de iniciadores SSR, com diferentes fluoróforos incorporados aos iniciadores diretos ('forward') e identificaram três grandes agrupamentos de Las, a partir da origem geográfica das plantas amostradas. Um formado por isolados do Brasil em conjunto com os do Leste e Sudeste da Ásia, outro da Flórida e um terceiro com isolados da Índia. A diversidade genética observada foi maior em isolados da China, que apresentaram 5,7 alelos por locus, seguida pela Índia com 5,4, Flórida com 3,6 e o Brasil apresentou 2,7 alelos por locus. No entanto, a diversidade genética foi superior em países asiáticos, seguido pelo Brasil. Já, isolados da Flórida apresentaram o menor índice de diversidade genética, quando comparados aos isolados das demais regiões geográficas. Neste trabalho foram analisadas poucas estirpes de Las do Estado de São Paulo e não estavam presentes amostras de todas as principais regiões citrícolas deste Estado brasileiro.

Sendo "*Ca. Liberibacter*" uma bactéria com ciclo de vida em dois hospedeiros distintos, planta e inseto, potencialmente estes podem atuar como modeladores da diversidade genética desta bactéria (ZHOU et al., 2011). Assim, estes dois ambientes totalmente distintos, células animal e vegetal, atuam como uma pressão de seleção em populações de "*Candidatus Liberibacter*".

Portanto, após 11 anos da constatação oficial do HLB e da sua rápida disseminação pelas principais regiões citrícolas do Estado de São Paulo, atingindo pomares dos Estados de Minas Gerais e Paraná, ainda não se tem muito conhecimento sobre a diversidade genética da principal espécie de bactéria associada à doença, "*Candidatus Liberibacter asiaticus*". A diversidade de Las em São Paulo, foi retratada apenas no trabalho de Islam et al. (2012), porém os dados são pouco representativos em termos de amostragem populacional.

2.4. As plantas de citros como hospedeiras de “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”

Trabalhos têm relatado que Las possui capacidade de multiplicação em todas as espécies cítricas e gêneros correlatos, no entanto, os cítricos apresentam respostas variáveis à infecção, mesmo com títulos bacterianos semelhantes, o que torna possível o agrupamento dos diferentes genótipos pelos sintomas gerados. Folimonova et al. (2009) separaram os genótipos de citros em quatro classes: sensíveis, com clorose severa nas folhas, crescimento lento e morte da planta; moderadamente tolerantes, com sintomas aleatórios, crescimento pouco reduzido e sem presença de planta morta; tolerantes, com poucos sintomas e crescimento normal e de reação variável, com sintomas severos e consequente redução do crescimento nas partes afetadas da planta. Na categoria dos genótipos sensíveis estão as laranjas doce (*Citrus sinensis*), clementinas (*C. clementina* Hort. ex. Tan.), pomelos (*C. paradisi* Macf.) e tangelos (*C. reticulata* Blanco x *C. paradisi*). Entre os tolerantes incluem-se o limão Eureka [*C. limon* (L.) Burm. f.], lima da Pérsia (*C. limettioides* Tanaka), citrange Carrizo (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) e *Severinia buxifolia*. Na classe das reações variáveis encontram-se as toranjas (*C. grandis* Osbeck), tangerina Cleópatra (*C. reshni* Hort. ex. Tan.) e kumquat (*Fortunella* sp), laranja Azeda (*C. aurantium* L.), limão Volkameriano (*C. volkameriana* Pasq.), citrumelo Swingle (*Poncirus trifoliata* L. Raf. x *C. paradisi*), lima ácida Galego [*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle] e tangerina Sun Chu Sha. Já *Poncirus trifoliata* não foi representado nessas categorias, devido à presença de poucas bactérias nesta espécie. Embora se saiba que existem diferenças na suscetibilidade de espécies e/ou variedades cítricas à Las, não se tem conhecimento se diferentes variedades em um único local poderiam ter alguma influência na diversidade de Las infectando estas plantas. ZHOU et al. (2011) estudaram os genes *hyvI* e *hyvII* presentes em isolados de Las, provenientes de diferentes hospedeiros e origem geográfica. Eles observaram uma hipervariação no número de repetições das sequências em ambos os genes de isolados da Flórida, Brasil, China, Tailândia, Índia e Filipinas. O amplicon *hyvI* refletiu maior variação em cítricos do que no inseto vetor, e variações puderam ser observadas também em mudas e porta-enxertos cítricos. No trabalho de Tomimura et al. (2009), a diversidade de Las foi estudada em várias regiões

genômicas e também foi verificada a relação da diversidade genética da bactéria com a origem geográfica dos isolados e diferentes cultivares de citros hospedeiros. A população de Las da Indonésia é homogênea, independente do tipo de hospedeiro cítrico e da localização do isolado no país. Porém, estes autores usaram sequências obtidas de regiões genômicas conservadas e com baixo potencial de distinguir variabilidade ao nível de estirpes, como o 16S rDNA, região espaçadora 16/23S e gene *omp*.

O Centro de Citricultura Sylvio Moreira do Instituto Agronômico – IAC hospeda um dos maiores Bancos Ativos de Germoplasma – BAG do mundo, com cerca de 1.500 introduções de laranjas-doce, tangerinas, limões, lima ácida, pomelos, toranjas e de outros gêneros afins, ocupando uma área de 10 ha. Estando a campo, as plantas que compõem o BAG não estão imunes à infecção por Las, da mesma forma que os pomares de cítricos do Estado de São Paulo. O manejo do BAG é conduzido segundo as normas mandatórias da IN - 53 que preconiza a eliminação de plantas doentes. Neste sentido, nesses últimos dois anos estão sendo mantidos em *freezers* os DNAs das plantas do BAG positivamente diagnósticas para Las. Esta coleção contempla representantes de um significativo número de variedades e espécies cítricas, para os estudos de diversidade genética de Las sob o efeito de diferentes espécies de hospedeiro.

2.5. Ferramentas para estudos de diversidade genética

Marcadores moleculares são as ferramentas mais usadas para estudos de diversidade genética, por serem capazes de caracterizar muitas amostras, mediante procedimentos rápidos. Portanto, muitos marcadores são usados para caracterizar populações de fitopatógenos como: “restriction fragment length polymorphism” (RFLP), “amplified restriction fragment length polymorphism” (AFLP) (LEE; GUNDERSEN-RINDAL; BERTACCINI, 1998; PAIVA et al., 2005; KISHI; WICKERT; LEMOS, 2008), “random amplified polymorphic DNA” (RAPD) (LYNCH; MILLIGAN, 1994; NELSON et al., 1997; COLETTA-FILHO; MACHADO, 2002), “single nucleotide polymorphisms” (SNP) (GUPTA; ROY; PRASAD, 2001; CARLSON et al., 2004), “multilocus sequence typing” (MLST) (ALMEIDA et al., 2008; YUAN et al., 2010) e

microsatélites (van BELKUM et al., 1998; LISTA et al., 2006; CHEN et al., 2010; KATOH et al., 2011; ISLAM et al., 2012; MATOS et al., 2013; CASAIS et al., 2014).

Uma das principais classes de marcadores moleculares usada atualmente tem como base as sequências simples repetitivas (SSR) presentes em tandem nos genomas dos procariotos. Embora ocorram diferentes categorizações para os SSRs, estes de uma maneira geral e segundo van Belkum et al. (1998) podem integrar quatro categorias diferentes, sendo: *i.* unidade repetitiva desagrupada ao longo do genoma; *ii.* tratos homopoliméricos que podem chegar a até 42 nucleotídeos; *iii.* sequências pequenas compostas por dois a seis nucleotídeos, esta categoria é mais frequente e susceptível à variação no número de unidades repetitivas em determinados locus e, *iv.* quando compostas por mais de oito nucleotídeos, que segundo o autor é bastante escasso. Os marcadores microsatélites estão associados com regiões hipervariáveis, apresentam alta resolução, herança mendeliana, são co-dominantes (no caso de eucariotos) e possibilitam a detecção de vários loci em uma mesma amplificação (multiplex), o que facilita a análise de muitos acessos em menor espaço de tempo (FIELD; WILLS, 1996; TÓTH; GÁSPARI; JURKA, 2000; AZOFEIFA-DELGADO, 2006; OLIVEIRA et al., 2006; FALEIRO, 2007; TROGGIO et al., 2007).

Os marcadores SSRs detectam polimorfismo em nível de genoma, o que possibilita a detecção de diferenças alélicas entre espécies próximas, dentro de uma espécie e entre indivíduos em uma determinada população. Eles são isentos da influência ambiental, consequentemente apresentam grande poder de discriminação, sendo altamente reprodutíveis (YU; PARK; POYSA, 1999; FRANCA et al., 2005; MARTÍNEZ et al., 2006).

Em procariotos, o número de repetições das sequências de nucleotídeos no locus gênico tende a sofrer mutação, principalmente, pelo “escorregamento” (*slippage*) da DNA polimerase durante a replicação, o que resulta na repetição, supressão ou adição de uma unidade repetitiva (van BELKUM et al., 1998; PINTO, 2006; COLETTA-FILHO; BITTLESTON; ALMEIDA, 2011). Com a disponibilidade da sequência completa do genoma de *Las* (DUAN et al., 2008, 2009; KATOH et al., 2014) facilitou o desenvolvimento de marcadores de DNA baseados em sequências repetitivas (CHEN et al., 2010; KATOH et al., 2011; ISLAM et al., 2012).

O uso de iniciadores marcados com diferentes fluoróforos e a resolução dos amplicons em eletroforese de capilar possibilitam uma maior sensibilidade na detecção de alterações na sequência repetitiva do locus gênico, no qual resultados favoráveis já foram obtidos em estudos com Las (ISLAM et al., 2012).

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral verificar se existe variabilidade genética dentro da espécie da bactéria “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” – Las, presente em diferentes espécies e variedades cítricas com HLB, em pomares das várias regiões dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná.

Para atingir o objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram desenvolvidos:

- a) Seleção dos iniciadores SSR;
- b) Padronização das amplificações da PCR para as regiões SSR (microsatélites) de Las;
- c) Genotipagem de Las presentes em plantas sintomáticas para HLB com os iniciadores SSR;
- d) Padronização das corridas de eletroforese de capilar no sistema ABI 3130 DNA Analyzer® (Applied Biosystems) para condições de multiplex;
- e) Sequenciamento dos produtos da PCR obtidos com os diferentes iniciadores SSR para verificação da reprodutibilidade dos resultados da eletroforese em capilar.
- f) Análise dos dados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Locais de amostragem

No total, foram analisadas 199 amostras de plantas cítricas infectadas com Las. Destas, 154 foram obtidas de laranjeiras doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) cultivadas

em diferentes regiões geográficas, sendo 128 provenientes de sete regiões geográficas citrícolas do Estado de São Paulo: Norte (n= 27), Leste (n= 51), Centro (n= 12), Centro-Leste (n= 8), Oeste (n= 2), Sudeste (n= 5) e Sul (n= 23) (Tabela 1). Além destas, 15 amostras foram coletadas na região Sudeste de Minas Gerais próxima a divisa com o Estado de São Paulo e 11 tiveram origem no Paraná, município de Paranaíba. E, mais 45 amostras foram coletadas de diferentes espécies e variedades cítricas presentes em coleções a campo cultivadas na região Sudeste do Estado de São Paulo (Tabela 2).

Tabela 1. Amostras de laranjeiras doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) cultivadas em diferentes regiões do Estado de São Paulo.

Regiões de São Paulo *EDA/Cidade	Nº de amostras
Norte	
Barretos/ Bebedouro	7
Barretos/Olímpia	2
Barretos/Colômbia	3
Catanduva/Catanduva	8
Jaboticabal/Jaboticabal	5
São José do Rio Preto /Nova Granada	1
São José do Rio Preto/Adolfo	1
Leste	
Limeira/Araras	2
Limeira/Limeira	9
Limeira/Pirassununga	8
Mogi Mirim/Artur Nogueira	5
Mogi Mirim/Conchal	2
Mogi Mirim/Holambra	8
Mogi Mirim/Jaguariúna	2
Mogi Mirim/Mogi Guaçu	5
Mogi Mirim/Mogi Mirim	5
São João da Boa Vista/Casa Branca	1
São João da Boa Vista/São João da Boa Vista	4

Tabela 1 continuação. Amostras de laranjeiras doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) cultivadas em diferentes regiões do Estado de São Paulo.

Regiões de São Paulo *EDA/Cidade	Nº de amostras
Centro	
Araraquara/Tabatinga	3
Araraquara/Matão	4
Jaú/Bariri	5
Centro-Leste	
Piracicaba/Piracicaba	4
Piracicaba/Santa Maria da Serra	4
Oeste	
Avaré/ Manduri	1
Ourinhos/São Pedro do Turvo	1
Sudeste	
Bragança Paulista/Bragança Paulista	1
Campinas/Jarinu	1
Mogi Mirim/Santo Antônio de Posse	2
Sorocaba/Cabreúva	1
Sul	
Avaré/Avaré	8
Botucatu/Pardinho	1
Botucatu/Pratânia	6
Itapeva/Itapeva	8
Total de amostras	128

*As amostras foram fornecidas pelo Escritório de Defesa Agropecuária (EDA) de cada região geográfica.

Tabela 2. Número de amostras de diferentes variedades e espécies cítricas cultivadas a campo na região Sudeste do Estado de São Paulo.

*Variedades	Espécies	Nº de amostras
Cidreira Mandonaro	<i>Citrus medica</i>	1
Citrage C-35	<i>Poncirus trifoliata</i> x <i>C. sinensis</i>	2
Citrumelo F - 80 – 7	<i>P.trifoliata</i> x <i>C. paradisi</i>	1
Citrus karna Seedling	<i>C.karna</i>	1
Laranjeira Azeda	<i>C. aurantium</i>	2
Laranjeira Dieberger – 3	<i>C. sinensis</i>	1
Laranjeira Imperial	<i>C. sinensis</i>	1
Laranjeira Lima Verde	<i>C. sinensis</i>	1
Laranjeira de Umbigo	<i>C. sinensis</i>	1
Laranja Raratonga	<i>C. sinensis</i>	1
Laranjeira Rosa	<i>C. sinensis</i>	1
Laranjeira Sanguínea de Mombuca cv. - EEL	<i>C. sinensis</i>	1
Laranjeira Valencia Tuxpan cn. - México	<i>C. sinensis</i>	1
Limoeiro Cravo	<i>C.limonia</i>	1
Limoeiro Cravo Limeira	<i>C.limonia</i>	3
Limoeiro Cravo Santa Bárbara	<i>C.limonia</i>	2
Limoeiro Cravo "penivesiculata"	<i>C.limonia</i> ou <i>C. pennivesiculata</i>	1
Limoeiro Rodrigues	<i>C. limon</i>	1
Limeira ácida Tahiti variegado (Caetano)	<i>C. latifolia</i>	1
Limoeiro Volkameriano catania 2	<i>C. volkameriana</i>	1
Limeira Francana	<i>C.aurantifolia</i>	1
Limoeiro Inerme	<i>C. limon</i>	1
Limoeiro Sanguíneo – 3	<i>C. limon</i>	1
Limoeiro 4 saisons variegado	<i>C. limon</i>	1
Tangeleiro Ambersweett - clone 1137	<i>C. reticulata</i> x <i>C. paradisi</i>	1
Tangerineira Venezuela	<i>C. reticulata</i>	1

Tabela 2 continuação. Número de amostras de diferentes variedades e espécies cítricas cultivadas a campo na região Sudeste do Estado de São Paulo.

*Variedades	Espécies	Nº de amostras
Tangerineira Poncan – 7	<i>C. reticulata</i>	1
Tangerineira Tresca x Dancy	<i>C. reticulata</i>	1
Tangoreira Umatilla	<i>C. unshiu</i> x <i>C. sinensis</i>	1
Toranjeira Sunshine	<i>C. grandis</i>	1
Toranjeira Yau Tau	<i>C. grandis</i>	1
Desconhecida	n.d.	9
Total de amostras		45

*Pertencentes à coleção de espécies cítricas mantidas a campo no Centro de Citricultura, em Cordeirópolis, SP.

4.2. Extração de DNA

O DNA total foi obtido do pecíolo e nervura central das folhas sintomáticas para HLB com uso do método CTAB segundo MURRAY; TOMPSON (1980). A concentração do DNA extraído foi medida com espectrofotômetro (absorbância 260/280) (LENINGER, 1975) no sistema NanoDrop (Thermo Scientific). A relação entre a absorbância a 260/280 é usada para avaliar a qualidade do DNA e RNA, pois as proteínas absorvem luz no comprimento de onda de 280 nm. A razão de absorbância 260/280 mais aceita seria a de 1,8 a 2,0 para DNA e RNA. Em proporções mais baixas em ambas as situações, pode indicar a presença de proteínas, fenol ou outros contaminantes que absorvem fortemente próximo a 280 nm (WILMINGTON, 2015).

4.3. Padronização da PCR

Amplificações foram padronizadas para os nove conjuntos de iniciadores selecionados (Tabela 3), com o intuito de estabelecer as condições mais adequadas de concentrações destes e temperatura de anelamento para cada conjunto. As condições de PCR já estabelecidas por Islam et al. (2012) e Katoh et al. (2011), para os seus respectivos conjuntos de iniciadores foram usadas para início dos testes de padronização da PCR. Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em tampão TAE 1x, em gel de agarose a 2,5%, contendo brometo de

etídeo na concentração de 10 mg/ml. Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados em sistema digital com aparelho fotodocumentador Image Quant 300 (Ge Healthcare Life Sciences) (Figura 2).

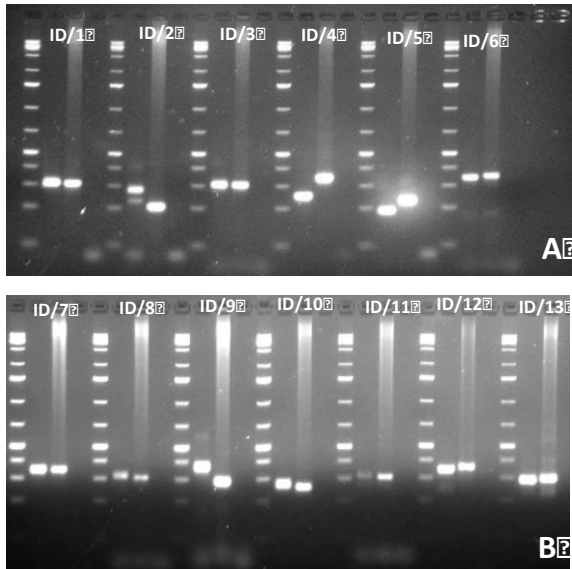


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose mostrando os padrões de amplicons obtidos com os iniciadores SSR. ID/1 a ID/13 refere-se aos iniciadores cuja identificação dos selecionados está na Tabela 3.

4.4. Eletroforese de capilar

Para possibilitar a visualização de um locus específico por corrida em eletroforese de capilar, os iniciadores diretos ('forward') de cada conjunto foram marcados com fluoróforos de cores diferentes (Tabela 3). As corridas foram realizadas em multiplex totalizando 3 conjuntos (SET) diferentes, o primeiro formado pelos iniciadores A, B e E, o segundo formado pelos iniciadores C, D e F, e o terceiro formado pelos iniciadores K005, K077 e CC01. (Tabela 3). Para compor cada conjunto os produtos da PCR foram diluídos na razão 2 µl do produto da PCR: 38 µl de água ultrapura Milli Q autoclavada e misturados, tomando-se 3 µl de cada produto de amplificação diluído. Em cada poço de uma placa de sequenciamento (Axygen) foi adicionado o mix contendo 10 µl de Hi-Di formamida (Applied Biosystems) e 0,1 µl do GeneScan – 500 Liz (Applied Biosystems) de tamanho molecular padrão. Posteriormente a esta mistura foi adicionado 1 µl do produto da PCR de cada conjunto multiplex.

Tabela 3. Iniciadores baseados em regiões genômicas repetitivas (SSR) de “*Ca. Liberibacter asiaticus*”, usados neste trabalho.

ID/Marcadores SSR	Sequência dos iniciadores	Unidade repetitiva
Fonte: Islam et al. (2012)*		
SET 1		
1/Las-SSR-A-f	CGCCTACAGGAATTTTCGTTACG - FAM	(TATTCTG)8
Las-SSR-A-r	TCTCATCTTGTTGCTTCGTTTATCC	
2/Las-SSR-B-f	ATCGCCTATAAATCCCTTTACTGATATGTTTCC - VIC	(TTTAA)6
Las-SSR-B-r	TGGTAACGGAAGTGATAATAACTACAGCAATAA	
5/Las-SSR-E-f	GATCAGTAGTCTATCACCCAC - NED	(CTTGTGT)5
Las-SSR-E-r	TACTGGAAACAAATGGAATAC	
SET 2		
3/Las-SSR-C-f	CGATTGTTGATGAATTACC - VIC	(CAGT)8
Las-SSR-C-r	GAATAGAAGAACCCTAAGC	
4/Las-SSR-D-f	CGGTGTCCGGTATCCGGTATCATTC - NED	(TTC)5
Las-SSR-D-r	CGAAGAAGAGACGGAGGTTAAGC	
6/Las-SSR-F-f	TCGTCTTATCGTATATCACTCC - FAM	(TTTACATC)3
Las-SSR-F-r	TTCACTATTAAGGATCAAGGC	
SET 3		
Fonte: Katoh et al. (2011)**		
10/K005-f	ATTGAAGGACGAAACCGATG - NED	(AGACACA)8
K005-r	TCCCAAGGTTTTCAAATTGC	
11/K077-f	TGACTGATGGCAAAGATGG - VIC	(TTTG)14
K077-r	AGACACGCCAAACAAGGAAT	
Iniciador desenvolvido para este trabalho**		
12/Las-CC01-f	CCCTTACTGATATGTTTCCGCATA - PET	(TTAAT)5
Las-CC01-r	CGGAAGTGATAATAACTACAGCAATAAG	

*NED / VIC / FAM - fluoróforos incorporados aos iniciadores diretos ('forward') que emitem comprimentos de onda nas cores: amarela (pico preto), verde e azul respectivamente.

**Os fluoróforos usados foram selecionados em função da combinação dos iniciadores para que pudesse ser padronizada a eletroforese de capilar em multiplex. PET – emite comprimento de onda na cor vermelha.

Em seguida as amostras foram desnaturadas em termociclador a 95°C durante 5 minutos. Os padrões de amplificação foram visualizados na plataforma de sequenciamento ABI 3130 DNA Analyzer® (Applied Biosystems), calibrada para a

leitura dos diferentes comprimentos de onda emitidos pelos fluoróforos (Figura 3), Os picos foram considerados a partir do primeiro ponto marcador na linha diagonal em vermelho, sendo os picos anteriores ao marcador considerados ruídos (Figura 3). Esta metodologia foi aplicada com sucesso para estudos de ecologia de *Xylella fastidiosa* (COLETTA-FILHO; BITTLESTON; ALMEIDA, 2011), *Bacillus anthracis* (LISTA et al., 2006), *Neisseria meningitidis* (SCHOULS et al., 2006) entre outros e foi implementada no laboratório de Biotecnologia do Centro de Citricultura Sylvio Moreira.

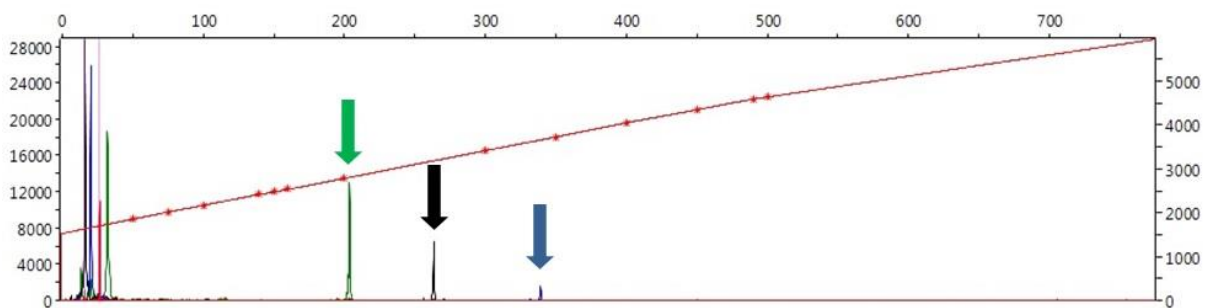


Figura 3. Eletroforese de capilar corrida no sequenciador ABI 3130 mostrando um padrão de amplicons obtidos com os iniciadores SSR selecionados. As setas em diferentes cores ilustram os amplicons resultados dos iniciadores ('forward') marcados com diferentes fluoróforos. O conjunto (SET) 1 ilustrado nas cores verde, preto e azul é formado pelos iniciadores B, E e A respectivamente. Vide Tabela 3 para informações dos iniciadores que compõem o conjunto.

4.5. Sequenciamento dos amplicons gerados com os iniciadores SSR

Para algumas amostras de DNA das plantas positivas para HLB os amplicons foram sequenciados diretamente, sem passar pelo processo de clonagem, com os mesmos iniciadores SSR que deram origem a estes. Para isso o produto da PCR foi purificado com o kit ExoSAP-IT® segundo as normas do fabricante Affymetrix e o sequenciamento realizado no sequenciador ABI 3130 DNA Analyzer® (Applied Biosystems) usando o Kit de sequenciamento BigDye® Terminator v 3.1 (APPLIED BIOSYSTEMS, 2002). Nas reações de amplificação para o sequenciamento foram usados 13 µl de Master Mix Taq DNA polimerase (Fermentas), 4 µl dos iniciadores direto/reverso, 2 µl de DNA e 7 µl de água (Thermo Scientific), totalizando o volume de 26 µl. As reações de amplificação dos fragmentos de DNA (PCR) foram realizadas em termociclador Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems), sendo as amostras submetidas à desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida

de 30 ciclos de amplificação a 95°C por 40 segundos, com temperatura de anelamento de 60°C para o iniciador B e 58°C para os demais iniciadores por 40 segundos, 72°C por 45 segundos e ao final, um ciclo de extensão a 72°C por 10 minutos. A purificação dos produtos obtidos da PCR foi realizada com 8 µl da enzima ExoSAP-IT® diluída em 20 µl do produto da PCR para cada iniciador reverso, posteriormente as amostras foram levadas ao termociclador nas condições de 37°C por 15 minutos, 80°C por mais 15 minutos e 25°C até a placa ser retirada do termociclador. As reações de sequenciamento foram conduzidas usando 2 µl do Kit Big Dye® Terminator v 3.1 (APPLIED BIOSYSTEMS, 2002), 2 µl do tampão Save Money, 1 µl do iniciador reverso diluído para 5 pmol, 2 µl de água (Thermo Scientific) e 3 µl do produto da PCR, totalizando o volume de 10 µl. As amplificações foram realizadas em placa de sequenciamento (Axygen) em termociclador programado para ciclagens a 96°C por 1 minuto, seguido de 25 ciclos a 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos, finalizando com 4°C até a placa ser retirada do termociclador. Em seguida, seguiu-se a precipitação do produto amplificado onde foi adicionado a cada amostra 100 µl de isopropanol (65%) sendo a placa mantida a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente, a placa foi centrifugada a 3.000 rpm por 45 minutos na temperatura de 22°C. O sobrenadante foi descartado e a placa deixada para secar, invertida, sobre papel toalha. Em seguida acrescentou-se 200 µl de etanol (60%) e centrifugou a 3.000 rpm por 10 minutos. Após descartado o sobrenadante repetiu-se a lavagem por mais uma vez, sendo que ao final a placa invertida foi centrifugada por 30 segundos a 1.000 rpm. Finalmente a placa ficou secando coberta com papel alumínio durante 1 hora em temperatura ambiente. Previamente ao sequenciamento foi adicionado para cada amostra 10 µl de Hi-Di formamida (Applied Biosystems) seguindo-se de desnaturação em termociclador a 95°C durante 5 minutos. Imediatamente após essa etapa, a placa foi deixada no gelo até ser submetida ao sequenciador ABI 3130 DNA Analyzer® (Applied Biosystems).

4.6. Análises estatísticas dos marcadores SSR

O tamanho dos amplicons SSR, quantificados em pares de base (pb) foram estimados pelo software Peak Scanner (Applied Biosystems) e seus valores absolutos usados para as análises estatísticas.

a) Diversidade clonal. Isolados mostrando o mesmo MLMG (*Multi-locus Microsatellite Genotype*) foram considerados como clones ou haplótipos, determinados pelo software GENODIVE (MEIRMANS; van TIENDEREN, 2004). Vários indicadores de diversidade genotípica foram estimados como: (i) número de genótipos por população; (ii) diversidade genotípica de Nei e (iii) fração clonal, calculado por $(1 - [\text{número de diferentes genótipos}]/[\text{total de números de isolados}])$ (ZHAN; PETTWAY; McDONALD, 2003). De cada uma das populações previamente definidas, somente um clone representante de cada MLMG foi selecionado sendo então construído um novo conjunto de dados que foi usado nas análises subsequentes.

b) Diversidade genética. A diversidade genética nas populações dada pela variação alélica foi estimada pelo índice de Nei (H_{Nei}), corrigido pelo número de indivíduos (n) na população pela fórmula $H_{Nei} = [(1 - \sum p_i^2) \times (n/n-1)]$, onde p_i é a frequência do alelo i no locus p (NEI, 1978) e também pela riqueza alélica dentro de cada população geográfica. Ambos os parâmetros foram gerados pelo software FSTAT versão 2.9.3.2 (GOUDET, 1995). A significância estatística entre os pares de comparação foram obtidos mediante 1.000 aleatorizações no FSTAT.

c) Diferenciação entre populações. A hipótese nula de não diferenciação genética entre as populações amostradas foi testada pelo índice F_{ST} (WRIGHT, 1951), gerado pelo software GENODIVE (MEIRMANS; van TIENDEREN, 2004). Considera-se as populações significativamente diferenciadas quando os valores obtidos são significativamente diferentes ($P < 0.05$) mediante 1.000 *bootstrapping* das MLMG sobre as populações.

Outro método usado para determinar o agrupamento das populações foi a análise de componentes principais (PCoA), usando o software GenAIEx (PEAKALL; SMOUSE, 2012).

O número de subpopulações geneticamente homogêneas (K) e os indivíduos que compõem estas subpopulações foram determinados usando o modelo

Bayesiano implementado pelo software BAPS 5.2 (CORANDER; WALDMANN; SILLANPÄÄ, 2003). Neste software foram realizadas independentes corridas adotando-se a função “cluster individuals”, como recomendado por Waples; Gaggiotti (2006), e os números de subpopulações (K) variaram entre um e trinta.

4.7. PCR *in silico* e análises das sequências obtidas dos amplicons SSR

PCR *in silico* foi realizado para cada um dos iniciadores usando as sequências da estirpe psy62 de Las, por meio das ferramentas disponíveis no site <http://insilico.ehu.es/> e as condições de menores restrições para as amplificações. Para análise das sequências geradas, estas foram trimadas para os iniciadores que as geraram sendo que os “reads” dos iniciadores direto e reverso de cada um dos amplicons foram usados para gerar os contigs. Estas atividades foram realizadas no software CLC Genomic Workbench Bio. As unidades de sequências repetitivas dentro de cada um dos programas foram identificadas visualmente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Marcadores SSR: padronização, amplificação e frequência alélica nas populações de Las

As padronizações de amplificação foram realizadas para cada um dos pares de iniciadores (Figura 2) obtendo-se amplicons para todos os conjuntos.

As condições estabelecidas para todos os iniciadores neste trabalho foram: desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos, seguida de 30 ciclos de amplificação a 94°C por 40 segundos, com temperatura de anelamento do iniciador B em 60°C e 58°C para os demais iniciadores, por 40 segundos, 72°C por 40 segundos e ao final, um ciclo de extensão a 72°C por 5 minutos. O iniciador B foi amplificado com maior temperatura de anelamento que os demais iniciadores devido à formação de banda inespecífica na temperatura de 58°C.

Devido ao sucesso nas amplificações todos os iniciadores diretos (‘forward’) foram sintetizados novamente, mas sendo estes marcados com diferentes fluoróforos.

Deste total de iniciadores testados, somente nove (Tabela 3) foram selecionados. A ocorrência de múltiplos picos foi muito mais frequente após a marcação dos iniciadores diretos ('forward') com os fluoróforos, uma vez que eletroforese de capilar é muito mais sensível. Assim, mesmo após o screening em gel de agarose e marcação com os fluoróforos, alguns pares de iniciadores foram descartados, resultando nos nove pares de iniciadores que foram usados para a análise de diversidade de Las neste trabalho. Nos últimos anos, técnicas de amplificação de DNA têm sido usadas com grande frequência para genotipagem de isolados bacterianos. De acordo com van Belkum et al (1998), a PCR pode ser usada também para o monitoramento de variações nos SSR.

A estabilidade e reprodutibilidade destes marcadores para estudos de populações de Las foi demonstrada no trabalho de Matos et al. (2013). Estes autores mostraram que o perfil de amplificação de uma população inicial de Las não foi alterado por passagens deste patógeno planta-a-planta por meio de inoculações ou pelo inseto vetor, assim como foi inalterada durante um período de 7 anos.

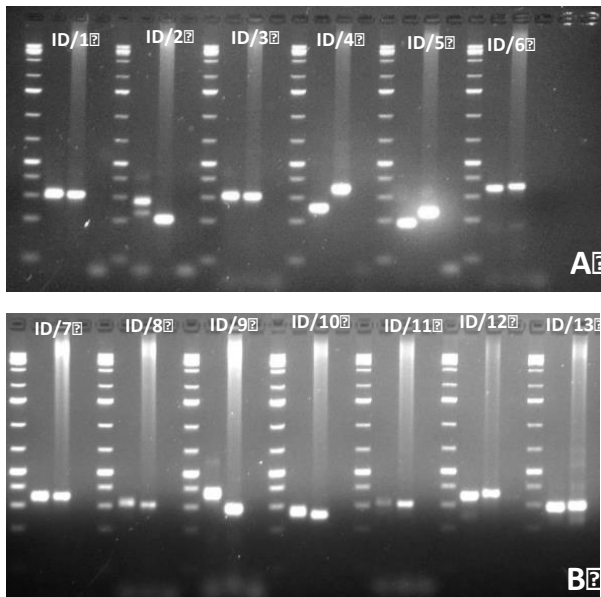


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose mostrando os padrões de amplicons obtidos com os iniciadores SSR. ID/1 a ID/13 refere-se aos iniciadores cuja identificação dos selecionados está na Tabela 3.

A frequência alélica dos nove loci SSR em populações de Las dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná, no Brasil, pode ser observada na Figura 4. Alelos privados estiveram presentes em todas as populações. Os conjuntos de iniciadores A, B, K005, E e F apresentaram polimorfismo em pelo menos uma população, enquanto que os iniciadores C, D, K077 e CC01 foram monomórficos para todas as populações (Figura 4). No presente trabalho, os locus A, K005, e E

apresentaram nove, seis e 10 alelos polimórficos, respectivamente. Para estas mesmas populações, os locus B e F apresentaram apenas dois alelos (Figura 4). Desta forma, dentre os marcadores polimórficos estudados, os marcadores indicados para as análises de diversidade genética de Las são A, K005 e E. O marcador B demonstrou diversidade apenas para poucas amostras da região Sul e o marcador F para as amostras das variedades cítricas, sendo ambos marcadores monomórfico para as demais amostras. Já os marcadores C, D, K077 e CC01 não possuem representatividade para estudos de diversidade genética de Las.

Katoh et al. (2011), analisando 21 isolados de Las da ilha principal de Okinawa, no Japão, encontraram sete alelos para o locus K005, número muito próximo ao obtido neste estudo. Já para o locus K077 aqueles autores obtiveram apenas três alelos, enquanto que neste estudo este locus apresentou-se monomórfico. Estes mesmos autores, analisando sete isolados de Las da ilha de Kikai, também do Japão, não encontraram polimorfismo para estes dois loci (K005 e K077), o que, segundo os autores, pode ser resultado da recente introdução da bactéria naquela ilha.

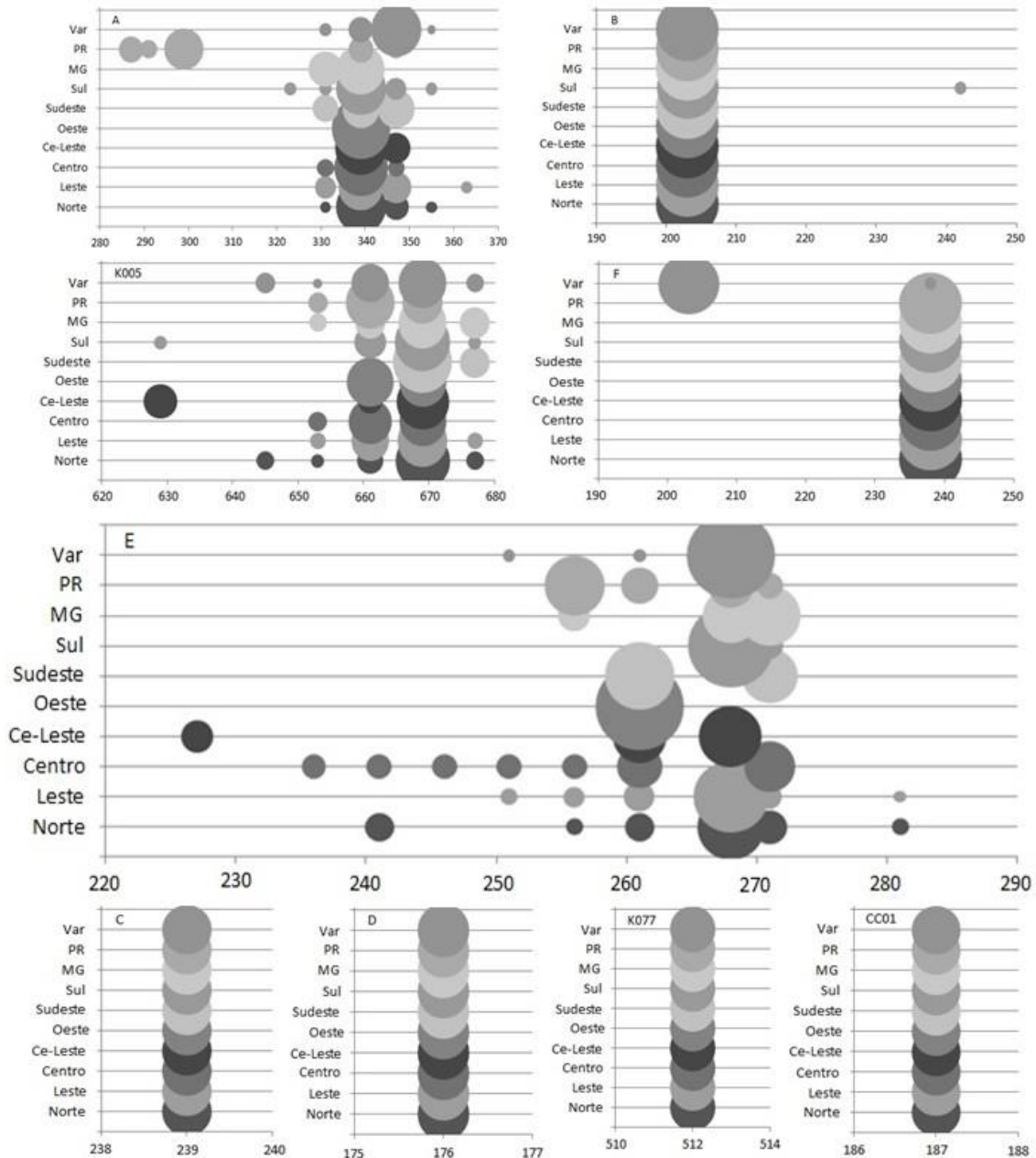


Figura 4. Distribuição da frequência alélica de nove loci SSR em populações de *Candidatus Liberibacter asiaticus* dos Estados de São Paulo (Norte, Leste, Centro, Ce-Leste, Oeste e Sul), Minas Gerais (MG), Paraná (PR) e Var (Diferentes variedades cítricas). Para mais informações dos loci vide Tabela 6.

5.2. Diversidade genética e genotípica

Um total de 199 amostras de Las obtidas de plantas sintomáticas para HLB de diferentes regiões geográficas do Estado de São Paulo, Minas Gerais e Paraná (Tabelas 1 e 2), foram amplificadas com os nove marcadores SSR (Tabela 3). Deste

total, 90 genótipos multilocos distintos (MLMG) foram identificados por marcadores microssatélites (Tabela 4). Os índices de diversidade genotípica foram relativamente elevados, com 0.98 de média total entre todas as populações. Dentre as regiões amostradas a maior diversidade genotípica foi encontrada para as amostras obtidas do Estado do Paraná (10 MLMG de 11 amostras – GD = 0.98). Consequentemente a fração clonal para estas amostras foi próxima à zero (ausência de clones). Interessantemente, a maior fração clonal (11 MLMG de 45 amostras – GD = 0.82; FC = 0.76) entre as populações de Las, foi obtida das amostras coletadas nas diferentes variedades e espécies cítricas cultivadas na região Sudeste do Estado de São Paulo.

Por outro lado, a diversidade genética (H_{Nei}), que leva em consideração a frequência alélica, variou de 0.111 a 0.256 entre as populações (Tabela 4), índices estes considerados moderados. A população de Las obtida na região Oeste foi a que apresentou menor índice de diversidade (H_{Nei}), significativamente inferior aos obtidos para as regiões Norte, Leste, Centro e Centro-Leste. Embora os cálculos de diversidade genética tenham sido obtidos com correção para o número de amostras na população, o pequeno número de amostras ($n = 2$) analisadas para a região Oeste pode ter afetado o valor de H_{Nei} . Assim, com exceção desta população, todas as demais apresentaram índices variando de 0.200 a 0.256. Valores de H_{Nei} muito superiores aos obtidos neste trabalho foram encontrados por Katoh et al. (2011) para uma população de 84 isolados japoneses de Las, esta grande diferença no índice de diversidade foi devido Katoh et al. (2011) terem usado somente marcadores polimórficos. Valores de H_{Nei} atingiram 0.86 e 0.60, respectivamente, para os iniciadores K005, K077. Já, Islam et al. (2012) obtiveram médias de H_{Nei} , por locus, variando de 0.204 a 0.881, com uso de seis (A, B, C, D, E e F) dos conjuntos de iniciadores usados no presente estudo. Estas discrepâncias de valores entre as populações de Las do Brasil e as analisadas por Katoh et al. (2011) e Islam et al. (2012) podem ser atribuídas a ocorrência recente de Las no Brasil quando comparado às populações asiáticas. Comparativamente, Matos et al. (2013), analisando as populações de Las obtidas da Flórida, México e alguns países da América Central usando também de marcadores SSR, encontraram somente duas classes de haplótipos de Las. Embora estes autores não tenham calculado nenhum

índice de diversidade genética, a ocorrência destas duas classes de haplótipos é consequência de um reduzido número de alelos o que supõe-se traduzir-se num valor moderado para o índice de diversidade genética.

Tabela 4. Diversidade genotípica (H_{GD}) e genética (H_{Nei}) de populações de “*Ca. Liberibacter asiaticus*” presentes em plantas de citros sintomáticas para HLB, de diferentes regiões geográficas do Brasil.

Populações	Tamanho População (n)	Num. (MLMG) ^a	Nei GD ^b	Fração Clonal - FC ^c	H_{Nei} ^{c*}
<i>Regiões geográficas do Estado de São Paulo</i>					
Norte	27	15	0.84	0.44	0.250a
Leste	51	17	0.90	0.67	0.256a
Centro	12	7	0.86	0.42	0.249a
Centro-Leste	8	5	0.86	0.38	0.244a
Oeste	2	2	1	0.00	0.111b
Sudeste	5	5	1	0.00	0.200b
Sul	23	9	0.72	0.61	0.235ab
Variedades	45	11	0.82	0.76	0.220ab
<i>Outros Estados</i>					
Minas Gerais	15	9	0.92	0.40	0.228ab
Paraná	11	10	0.98	0.09	0.240ab
Total	199	90	0.98	0.55	0.236

^a MLMG: Genótipos Microsatélites Multilocos.

^b Valores de diversidade genotípica corrigidos para o tamanho da população. Estes valores podem variar de 0 à 1.

^c H_{Nei} : frequência alélica. Para maiores detalhes de como esse índice foi estimado vide material e métodos.

* Letras iguais não diferem a 5%.

5.3. Diferenciação genética entre as subpopulações

A análise de diferenciação entre pares de populações foi baseada na estatística F de Wright, usando a soma do quadrado das diferenças em número de repetições (F_{ST}), sob o modelo de passos mutacionais (Stepwise Mutation Model - SMM) (KIMURA; OHTA, 1975) (Tabela 5). Baixos valores para F_{ST} , variando de aproximadamente $F_{ST} = 0,00$ a $0,083$, foram encontrados quando as subpopulações de Las amostradas em São Paulo foram comparadas aos pares, assim como com a população deste patógeno amostrada em Minas Gerais. Pelas análises de *bootstrapping* ($n = 1000$), entre estes valores de F_{ST} , observa-se que todas as populações de Las, nas diferentes regiões do Estado de São Paulo, não diferiram

estatisticamente ($P < 0.05$) quando comparadas aos pares, assim como ocorreu com a população de Minas Gerais. Isto significa que passados 10 anos da introdução de Las em São Paulo, ainda não pode ser observado qualquer efeito ambiental que possa estar atuando para propiciar diferenças genéticas significativas entre as populações deste patógeno, presentes nas plantas cítricas cultivadas nestas diferentes regiões geográficas analisadas. O primeiro relato de Las no Brasil deu-se em 2004 de amostras coletadas na região Central do Estado de São Paulo (COLETTA-FILHO et al., 2004a). Atualmente, cerca de 10 anos após, a bactéria já foi encontrada em cerca de 300 municípios paulista, 20 mineiros (principalmente na divisa Sul com o Estado de São Paulo) e em 90 municípios do Estado do Paraná. Neste último caso, infecções são observadas em plantas de regiões vizinhas a São Paulo (Norte - Centro do Estado do Paraná) indo até ao extremo Oeste daquele Estado (LEITE JÚNIOR, 2014). Para o início da epidemia do HLB em São Paulo não pode ser descartada a disseminação via mudas, pois quando do primeiro relato da presença de Las no Brasil, a produção de mudas sob ambiente protegido estava apenas iniciando. Aliado a isto, segundo relato de alguns produtores plantas com sintomatologia de HLB já estavam sendo observadas no campo a pelo menos uns 5 anos, o que coincidiria com a produção de mudas ainda em ambiente aberto.

Tendo-se em vista que no Estado de São Paulo o sistema de produção de mudas em ambientes fechados, livre de insetos vetores, é obrigatório por lei desde 2003, assume-se que a partir daquela data a ampla e rápida disseminação da bactéria planta-a-plantas no Estado de São Paulo é devido ao inseto vetor (*D. citri*). Supõe-se que o mesmo possa estar ocorrendo nos outros dois Estados (Paraná e Minas Gerais), uma vez que as plantas infectadas com Las são encontradas nas regiões limítrofes com São Paulo. Embora os psílídeos (*D. citri*) adultos não migrem ativamente a longas distâncias, passivamente podem ser levados por correntes de ar (KOBORI et al., 2011), ou mesmo em superfície de frutos ou folhas (HALBERT et al., 2010). Fato é que quando contaminados na fase ninfal são altamente eficientes na transmissão de Las (INOUE et al., 2009, PELZ-STELINSKI, et al., 2010). Porém, não pode ser excluída a hipótese de eventos diferentes de introduções que ocorreram em São Paulo e no Paraná.

Recentemente foi mostrado, com base em marcadores SSR e análise de alguns isolados de São Paulo e de países do continente Asiático, que provavelmente a bactéria Las, encontrada aqui no Brasil, tenha a China ou o Japão como origem (ISLAM et al., 2012). Com base nos dados publicados por Islam et al. (2012) e nos resultados do presente trabalho, aparentemente tenha ocorrido uma única introdução em São Paulo. Assim, os dados aqui apresentados fortemente sugerem que a população de Las introduzida e estabelecida na região Central do Estado de São Paulo foi disseminada por mudas para as demais regiões do Estado. Até o presente, diferenças de ambientes entre estas regiões, principalmente temperatura, não foram suficientemente impactantes para resultar em padrões de populações específicas a uma ou outra região. Estes resultados são diferentes dos obtidos para outra bactéria que causa problemas em laranjeiras doce, a *Xylella fastidiosa* agente causal da CVC. Neste caso observa-se uma forte estruturação genética entre as populações das diferentes regiões produtoras de São Paulo (COLETTA-FILHO et al., 2003; 2013). Porém, enquanto Las é citros específica e é transmitida por um vetor que tem os cítricos como hospedeiro preferencial (BOVÉ, 2006), *X. fastidiosa* é um patógeno generalista podendo a mesma subespécie ser encontrada em diferentes espécies de plantas sendo estas reservatórios naturais da bactéria (LOPES et al., 2003) e os vetores, as cigarrinhas, são polípagas (REDAK et al., 2004).

Diferentemente da homogeneidade entre as subpopulações de Las das regiões de São Paulo e Minas Gerais, as do Paraná foram geneticamente diferentes quando comparadas a algumas sub-regiões de São Paulo como Norte, Leste, Sudeste e Sul, e Minas Gerais (Tabela 5). Condições específicas locais podem ter contribuído para esta diferenciação, assim como não pode ser descartada uma introdução diferente da ocorrida em São Paulo. Estudos envolvendo populações de Las amostradas de sub-regiões geográficas no Paraná precisam ser conduzidos para comprovação destas hipóteses. Interessantemente, índices de diferenciação genética ainda maiores e significativamente diferentes foram obtidos quando comparou-se as populações de Las obtidas das diferentes regiões geográficas com a população obtida de diferentes variedades cítricas (Tabela 5). Estes valores de F_{ST} variaram de 0.275 a 0.445, portanto muito maiores aos obtidos quando se comparou

as diferentes regiões geográficas, onde a totalidade das amostras foram coletadas de laranjeiras doce como hospedeiras do patógeno. Estes resultados fortemente sugerem que a diversidade genética da população de Las está sendo modulada pelos diferentes genótipos dos hospedeiros cítricos amostrados. Embora todas as variedades e espécies cítricas sejam susceptíveis a Las, diferentes graus de susceptibilidade são observados (BOVÉ, 2006). Esta interação hospedeiro – patógeno é apontada como um dos principais fatores na modulação de população de patógenos (LEROY et al., 2013). Porém, curiosamente o índice de diversidade genética de Las nestas condições de múltiplas espécies /variedades de hospedeiros não foi significativamente diferente do obtido para condições de hospedeiros clonais (Tabela 4), contrário ao observado para outros patossistemas como *Xanthomonas manihotis* e *Pseudomonas* (HAUBOLD; RAINEY, 1996; RESTREPO et al., 2000, 2004). Análises mais detalhadas não possibilitaram a associação de um perfil genético específico de Las a uma determinada espécie cítrica, corroborando com o trabalho de Tomimura et al. (2009).

Resultados das análises baseadas em coordenada principal (PCoA) e em estatística Bayesiana (BAPS) usando os 90 diferentes genótipos de Las definidos pelos nove multilocos SSR resultaram em três clusters genéticos distintos (Figuras 5 e 6), concordando com os dados de diferenciação genética (F_{ST}) discutidos acima. Os isolados de Las de todas as regiões geográficas do Estado de São Paulo juntamente com os de Minas Gerais formaram um único cluster, enquanto que os isolados de Las com origem no Paraná e nas diferentes variedades cítricas agruparam-se em outros dois clusters, caracterizando três clusters genéticos distintos. O princípio destas análises é que dentro de cada um destes grupos os indivíduos são geneticamente mais próximos possíveis e compartilham ancestrais semelhantes (CORANDER; WALDMANN; SILLANPÄÄ, 2003; MA; AMOS, 2012). Portanto, pode-se afirmar que a população de Las amostrada no Estado do Paraná é estatisticamente diferente da amostrada nas diferentes regiões geográficas de São Paulo e Minas Gerais, sendo que estas também são diferentes das amostras das diferentes variedades cítricas. Considerações sobre a origem destas diferenças foram traçadas acima.

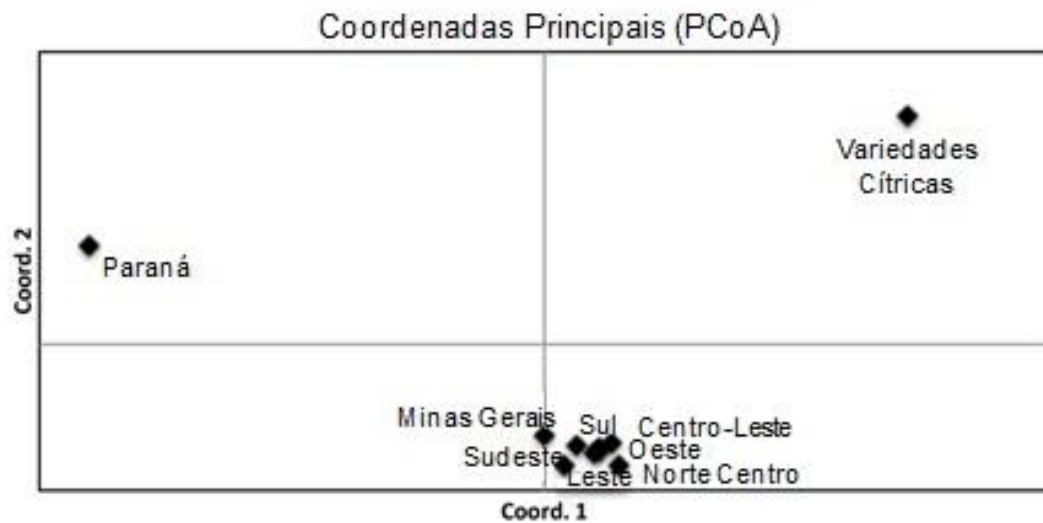


Figura 5. Análise de Coordenada Principal (PCoA) de estirpes de *Ca. Liberibacter asiaticus* amostradas de plantas cítricas com HLB cultivadas nas diferentes regiões geográficas do Estado de São Paulo, no Paraná e em Minas Gerais, e diferentes variedades cítricas.

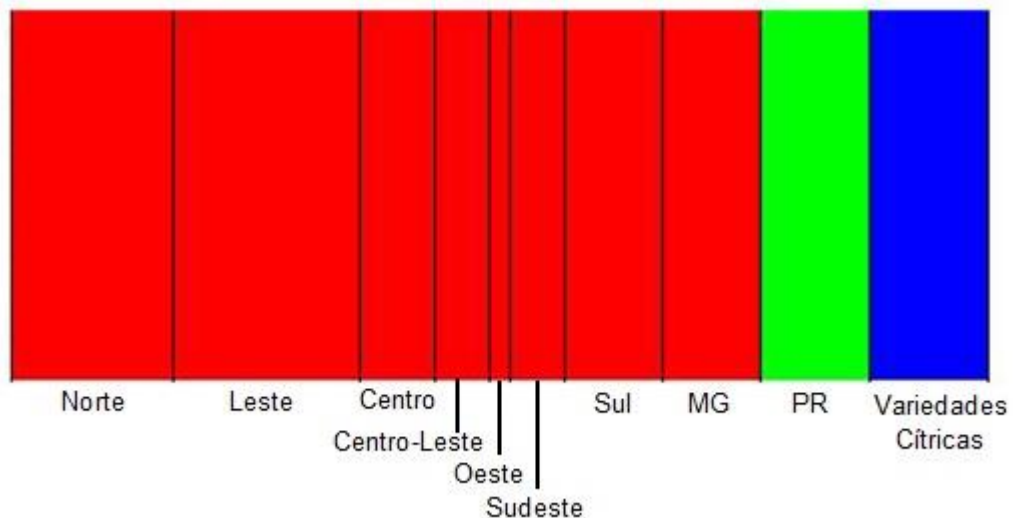


Figura 6. Resultados do agrupamento de indivíduos pelo software BAPS para isolados de *Ca. Liberibacter asiaticus*. Diferentes cores identificam clusters geneticamente distintos. Cluster com cor vermelha comporta os isolados de Las de diferentes regiões geográficas do Estado de São Paulo (Norte, Leste,...Sul e Minas Gerais (MG)). Verde representa os isolados do Paraná (PR) e em azul estão os isolados das diferentes variedades cítricas mantidas em coleções a campo na região Sudeste do Estado de São Paulo (vide tabela 2).

Tabela 5. Medidas de diferenciação entre pares de populações de “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” baseadas na estatística F_{ST} .

Populações^a	Norte	Leste	Centro	Centro-Leste	Oeste	Sudeste	Sul	Minas Gerais	Paraná	Variedades
Norte	-									
Leste	0.014	-								
Centro	0.033	0.009	-							
Centro-Leste	0.044	0.005	0.009	-						
Oeste	0.010	0.080	0.083	0.063	-					
Sudeste	0.007	0.058	0.051	0.020	0.033	-				
Sul	0.014	0.004	0.088	0.008	0.095	0.029	-			
Minas Gerais	0.017	0.031	0.000	0.083	0.055	0.080	0.025	-		
Paraná	0.099^b	0.074	0.058	0.109	0.135	0.191	0.154	0.118	-	
Variedades	0.302	0.290	0.368	0.298	0.445	0.388	0.275	0.364	0.386	-

^aNorte, Leste, Centro, Centro-Leste, Oeste, Sudeste e Sul são regiões geográficas do Estado de São Paulo. Minas Gerais e Paraná são amostras de outros Estados brasileiros. Variedade são amostras de coleções mantidas a campo (vide tabela 2).

^bNúmeros em negrito identificam comparações significativas ($P < 0.05$) com base em números de 1.000 aleatorizações.

5.4. PCR *in silico* e análises das sequências obtidas dos amplicons SSR

Com objetivo de analisar a repetitividade da ferramenta usada para gerar os dados aqui analisados, foram realizados ensaios de PCR *in silico* confrontando estes com os do PCR *in loco* e sequenciamento do amplicon.

O PCR *in silico* foi realizado para cada um dos iniciadores usando as sequências da estirpe psy62 de Las, as ferramentas disponíveis no site <http://insilico.ehu.es/> e as condições de menores restrições para as amplificações.

O número de unidades repetitivas, encontradas nas sequências extraídas da PCR *in silico*, foi diferente das obtidas com o sequenciamento dos amplicons obtidos com a PCR *in loco* (Tabela 6). O genoma de Las (estirpe psy62), sobre o qual se fez a PCR *in silico* tem origem na Flórida, cuja população de Las é diferente da encontrada em São Paulo (MATOS et al., 2013). Para os loci A, E e K005, o número de unidades repetitivas foi muito maior no isolado de Las de São Paulo que no da Flórida. Para os loci C, F e CC01, as unidades repetitivas se mantiveram entre os dois isolados, enquanto que para os loci D e K077, o isolado psy62 apresentou maior número de unidades repetitivas que o isolado de Las de São Paulo. A não amplificação do locus B na PCR *in silico* se deve provavelmente pela alta stringência desta. Estes resultados podem estar relacionados com a região genômica codificante, pois observa-se que os loci A, E e K005 apresentam maior número de unidades repetitivas no isolado de Las de São Paulo, sendo que o locus A apresenta a região genômica codificante para a enzima citidina desaminase e, os loci E e K005 apresentam a região genômica codificante para a proteína repressora do bacteriófago C1. A Figura 7 ilustra os números de unidades repetitivas encontradas nas sequências dos amplicons dos loci A, C e F, obtidas pelos PCR *in silico* e *in locus*. Observa-se claramente a adição e subtração da unidade repetitiva, resultado principalmente do “escorregamento” (*slippage*) da DNA polimerase durante a replicação do DNA (van BELKUM et al., 1998; PINTO, 2006).

Ainda comparando-se a repetibilidade da técnica em uso, observa-se, na Tabela 7 pela análise de outras duas amostras (IndE28 e IndE29) com os locus A, E e K005, que o tamanho do amplicon foi diretamente relacionado com o número de unidades repetitivas, demonstrando a estabilidade e eficiência da técnica, tal como também demonstrado por Matos et al. (2013).

Tabela 6. PCR *in silico* realizado no site <http://insilico.ehu.es/PCR/> mantendo-se as menores estringências.

Iniciadores	Unidade repetitiva amplificada	Posição no Genoma através da PCR <i>in silico</i> ¹	No. de unidades perfeitas presentes na sequência <i>In silico</i>	No. de unidades perfeitas presentes no amplicon sequenciado	Região genômica codificante
A	(TATTCTG) ₈	255473 - 255749	8	17	Citidina/desaminase
B	(TTTAA) ₆	---- ²	0	5	Sem codificação
C	(CAGT) ₈	537628 - 537853	8	9	Sem codificação
D	(TTC) ₅	377674 - 377846	5	2	Proteína hipotética
E	(CTTGTGT) ₅	354420 - 354609	5	15	Proteína repressora do bacteriófago C1
F	(TTTACATC) ₃	684033 - 684272	3	3	Sem codificação
K005	(AGACACA) ₅	354226 - 354823	5	15	Proteína repressora do bacteriófago C1
K077	(TTTG) ₁₄	655219 - 655746	14	8	ATP sintase subunid. delta
CC01	(TTAAT) ₅	535130 - 535312	5	5	Componente pilin Flp/Fap

¹Os números referem-se à posição amplificada pelos iniciadores no genoma da estirpe *Candidatus Liberibacter asiaticus* psy62.

²Ausência de amplificação através da PCR *in silico*. Atribui-se as altas condições de estringências da PCR *in silico*.

Iniciador A - (TATTCTG)8

Primer F: CGCCTACAGGAATTCGTTACG
Primer R: TCTCATCTTGTTGCTTCGTTTATCC

A. **Análise *In silico***

>NC_012985, from 255473 to 255749 (277 bp);
 CandidatusLiberibacterasiaticus str. psy62
 TCTCATCTTGTTGCTTCGTTTATCC...CAGAATACAGAATACAGAATACAGA
 ATACAGAATACAGAATACAGAATACAGAATA...CGTAACGAAATTCCTGTA
 GGCG

B. > Sequência consenso do amplicon gerado pelo conjunto de iniciadores A

AAAC...CAGAATACAGAATACAGAATACAGAATACAGAATACAGAATACAGA
 ATACAGAATACAGAATACAGAATACAGAATACAGAATACAGAATACAGAATA
 CAGAATACAGAATACAGAATA...CGTAACGAAATTC

Iniciador C – (CAGT)8

Primer F: CGATTGTTGATGAATTACC
Primer R: GAATAGAAGAACCCTAAGC

A. **Análise *In silico***

>NC_012985, from 537628 to 537853 (226 bp);
 CandidatusLiberibacterasiaticus str. psy62
 CGATTGTTGATGAATTACC...CAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCA
 GT...GCTTAGGGTTCTTCTATTC

B. > Sequência consenso do amplicon gerado pelo conjunto de iniciadores C

AATTACC...CAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGT...TTCC

Iniciador F - (TTTACATC)3

Primer F: TCGTCTTATCGTATATCACTCC
Primer R: TTCACTATTAAGGATCAAGGC

A. **Análise *In silico***

>NC_012985, from 684033 to 684272 (240 bp);
 CandidatusLiberibacterasiaticus str. psy62
 TTCACTATTAAGGATCAAGGC...TTTACATCTTTACATCTTTACATC...GGA
 GTGATATACGATAAGACGA

B. > Sequência consenso do amplicon gerado pelo conjunto de iniciadores F

...TTTACATCTTTACATCTTTACATC...GGAGTGATAT

Figura 7. Número de unidades repetitivas (destacadas em verde e azul) encontradas nas sequências dos amplicons gerados pelos iniciadores A, C e F. (A.) PCR *in silico* realizada com o isolado psy62 de Las da Flórida. (B.) PCR *in locus* com Las de São Paulo (>sequência consenso do amplicon...).

Tabela 7. Comparações entre tamanho do amplicon (número inteiro com 3 dígitos) obtido pelo método de *Fragment Analysis* e número de unidade repetitiva (entre parênteses) observada após sequenciamento do amplicon.

Amostras/ Iniciadores	SET A (TATTCTG) ₈	SET E (CTTGTGT) ₅	SET K005 (AGACACA) ₈
IndE28	339 (17)	271 (13)	669 (16)
IndE29	331 (16)	256 (10)	653 (13)

6. CONCLUSÕES

As análises realizadas neste trabalho possibilitaram concluir que:

1. As populações de “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” presentes nos locais de ocorrência de HLB no Brasil apresentam uma alta diversidade genotípica e uma baixa diversidade genética.
2. As populações deste patógeno presentes nos Estados de São Paulo e Minas Gerais são similares, mas diferentes da observada no Estado do Paraná.
3. Diferentes espécies cítricas cultivadas numa mesma área hospedam populações de “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” geneticamente heterogêneas das encontradas em hospedeiros de uma única espécie, no caso laranjeiras doce.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGNELLI, A. R. **Potencial de agentes indutores de resistência para o controle da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* em plantas cítricas**. 2011. 44 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Instituto Fundecitrus, Araraquara, 2011.
- ALBRECHT, U.; BOWMAN, K. D. Tolerance of the trifoliolate citrus hybrid US-897 (*Citrus reticulata* Blanco x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) to Huanglongbing. **HortScience**, v. 46, n. 1, p. 16–22. 2011.
- ALBRECHT, U.; MC COLLUM, G.; BOWMAN, K. D. Influence of rootstock variety on Huanglongbing disease development in field-grown sweet orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) trees. **Scientia Horticulturae**, v. 138, p. 210-220, 2012.
- ALMEIDA, R. P. P.; NASCIMENTO, F. E.; CHAU, J.; PRADO, S. S.; TSAI, C. W.; LOPES, S. A.; LOPES, J. R. S. Genetic structure and biology of *Xylella fastidiosa* strains causing disease in citrus and coffee in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 12, p. 3690–3701, 2008.
- ANJOS-DUARTE, C. S.; BARBOSA, C. J.; NASCIMENTO, A. S.; DIAS, M. C.; SILVA, S. X. B. **Huanglongbing (ex-greening): um alerta aos citricultores da Bahia**. Grupo Cultivar, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2011.
- APPLIED BIOSYSTEMS. **BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit**, 2002. Disponível em: <www.ibt.lt/sc/files/BDTv3.1_Protocol_04337035.pdf> Acesso em: 26 jan. 2015.
- AZOFEIFA-DELGADO, Á. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. **Agronomía Mesoamericana**, v. 17, n. 2, p. 221-242, 2006.
- BASSANEZI, R. B.; MONTESINO, L. H.; STUCHI, E. S. Effects of huanglongbing on fruit quality of sweet orange cultivars in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10658-009-9506-3>>.
- BASTIANEL, C.; GARNIER-SEMANCIK, M.; RENAUDIN, J.; BOVÉ, J. M.; EVEILLARD S. Diversity of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”, based on the *omp* gene sequence. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 6473-6478, 2005.

BELASQUE JR. J.; YAMAMOTO, P. T.; MIRANDA, M. P.; BASSANEZI, R. B.; AYRES, A. J.; BOVÉ, J. M. Controle do *huanglongbing* no estado de São Paulo, Brasil. **Citrus Research & Technology**, v. 31, n. 1, p. 53-64, 2010.

BOVÉ, J. M.; CALAVAN, E. C.; CAPPOR, S. P.; CORTEZ, R. E.; SCHWARZ, R. E. Influence of temperature on symptoms of California stubborn, South Africa greening, India citrus decline, and Philippines leaf mottling diseases. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 6., Berkeley. **Proceedings...** Berkeley: IOCV, p. 12-15, 1974.

BOVÉ, J. M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, v. 88, p. 7-37, 2006.

BURCKHARDT, D; OUVRARD, A. A revised classification of the jumping plant-lice (Hemiptera: Psylloidea). **Zootaxa** 3509, p. 1-34, 2012.

CAPOOR, S. P.; RAO, D. G.; VISWANATH, S. M. *Diaphorina citri* Kuwayama., a vector of greening disease of citrus in India. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 37, p. 572-576, 1967.

CAPOOR, S. P.; RAO, D. G.; VISWANATH, S. M. Greening disease of citrus in the Deccan Trap Contry and its relationship with the vector, *Diaphorina citri* Kuwayama. In: Weathers LG & Cohen M (Eds.) Proceedings of the 6th **Conference of the International Organization of Citrus Virologists**, University of California, Division of Agricultural Sciences, p.43-49, 1974.

CARLSON, C. S.; EBERLE, M. A.; RIEDER, M. J.; YI, Q.; KRUGLYAK, L.; NICKERSON, D. A. Selecting a maximally informative set of Single-nucleotide polymorphisms for association analyses using linkage disequilibrium. **The American Journal of Human Genetics**, v. 74, p. 106-120, 2004.

CAS AIS, V. O.; PATROCÍNIO, E.; OLIVEIRA, S. A. S.; SCHNADELBACH, A. S.; BARBOSA, C. J.; BARBOSA, L. V. Diversidade genética de *Xylella fastidiosa* em regiões produtoras de citros na Bahia, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 1, p. 26-33, 2014.

CHEN, J.; DENG, X.; SUN, X.; JONES, D.; IREY, M.; CIVEROLO, E. Guangdong and Florida populations of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' distinguished by a genomic locus with short tandem repeats. **Phytopathology**, v. 100, p. 567-572, 2010.

CLC GENOMICS WORKBENCH Bio. Disponível em <http://www.clcbio.com/index.php?id=27>. Acesso em: 16 fev. 2015.

COERINI, L. F. **Expressão de genes das vias de jasmonato e etileno na resposta de plantas de citros às bactérias *Candidatus Liberibacter* spp., causadoras do Huanglongbing.** 102 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2014.

COLETTA-FILHO, H. D.; MACHADO, M. A.. Evaluation of genetic structure of populations of *Xylella fastidiosa* from different *Citrus sinensis* varieties. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 3731-3736, 2002.

COLETTA-FILHO, H. D.; MACHADO, M. A. Geographical Genetic Structure of *Xylella fastidiosa* from Citrus in São Paulo State, Brazil. **Phytopathology**, v. 93, n. 1, p. 28-34, 2003.

COLETTA-FILHO, H. D.; TARGON, M. L. P. N.; TAKITA, M. A.; DE NEGRI, J. D., Pompeu, Jr. J.; Machado, M. A. First report of causal agent of huanglongbing ("*Candidatus Liberibacter asiaticus*") in Brazil. **Plant Disease**, v. 88, 1382p., 2004a.

COLETTA-FILHO, H. D.; TAKITA, M. A.; TARGON, M. L. P. N.; CARLOS, E. F.; MACHADO, M. A. A bactéria *Candidatus Liberibacter* em plantas com *Huanglongbing* (ex-greening) no estado de São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis, v.25, n.2, p.367-374, 2004b.

COLETTA-FILHO, H. D., TAKITA, M. A., TARGON, M. L. P. N.; MACHADO, M. A. Analysis of the 16S rDNA sequences from citrus-huanglongbing bacteria reveal a different "Ca. Liberibacter" strain associated to the citrus disease in Sao Paulo, Brazil. **Plant Disease**, v. 89, p. 848-852, 2005.

COLETTA-FILHO, H. D.; BITTLESTON, L. S.; ALMEIDA, R. P. P. Spatial genetic structure of a vector-borne generalist pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 2596-2601, 2011.

COLETTA-FILHO, H. D.; GONÇALVES, F. P.; AMORIM, L.; SOUZA, A. A.; MACHADO, M. A. Survey of *Xylella fastidiosa* and citrus variegated chlorosis in São Paulo State, Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 95, n. 3, p. 493-498, 2013.

CORANDER, J.; WALDMANN, P.; SILLANPÄÄ, M. J. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. **Genetics**, v. 163, p. 367–374, 2003.

COSTA LIMA, A. M. **Insetos do Brasil: homópteros**. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, v. 3, 101 p., 1942.

DA GRAÇA, J. V. Citrus greening disease. **Annual Review Phytopathology**, v. 29, p. 109-136, 1991.

DEL GUERCIO, G. Note ed osservazioni di entomologia agrária. Il cecídio dele foglia del limone ed il suo cecidozoo in *Eritrea*. **Agriculture coloniale**, p.167-169, 1918.

DUAN, Y. P.; ZHOU, L. J.; HALL, D.; LI, W. B.; LIU, L.; GOTTWALD, T. **Genome sequencing of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the causal agent of citrus Huanglongbing (greening) in Flórida**. 11th International Citrus Congress, Wuhan, China, 52 p., 2008.

DUAN, Y.; ZHOU, L.; DAVID, G.; HALL, D. G.; LI, W.; DODDAPANENI, H.; LIN, H.; LIU, L.; VAHLING, C. M.; GABRIEL, D. W.; WILLIAMS, K. P.; DICKERMAN, A.; SUN, Y.; GOTTWALD, T. Complete Genome Sequence of Citrus Huanglongbing Bacterium, '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' Obtained Through Metagenomics. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 22, n. 8, p. 1011-1020, 2009.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Embrapa Cerrados, 102p. 2007.

FIELD, D.; WILLS, C. Long polymorphic microsatellites in simple organisms. Proceeding of the Royal Society of London, Series B: **Biological Sciences**, v. 263, p. 209-215, 1996.

FRANCIA, E.; TACCONI, G.; CROSATTI, C.; BARABASCHI, D.; BULGARELLI, D.; DALL'AGLIO, E.; VALE, G. Marker assisted selection in crop plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 82, p. 317–342, 2005.

FOLIMONOVA, S. Y.; ROBERTSON, C. J.; GARNSEY, S. M.; GOWDA, S.; DAWSON, W. O. Examination of the responses of different genotypes of citrus to *Huanglongbing* (citrus greening) under different conditions. **Phytopathology**, v. 99, p. 1346-1354, 2009.

FUNDECITRUS. Possibilidade de controle: inimigo natural do vetor do greening é encontrado no Brasil. **Revista do Fundecitrus**, Araraquara, v. 21, n.126, p. 8-9, 2005.

GARNIER, M.; DANIEL, N.; BOVÉ, J. M. **The greening organism is a gram-negative bacterium.** p. 115-124. *In.* Garnsey SM, Timmers LW & Dodds JA (eds.) Proceedings of the 9th International Conference of Citrus Virologists. University of California, Riverside. 1984.

GARNIER, M.; GAO S. J.; HE, Y. L.; VILLECHANOUX, S.; GANDAR, J.; BOVÉ, J. M. **Study of the greening organism (GO) with monoclonal antibodies: serological identification, morphology, serotypes and purification of the GO.** *In.* Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Proceedings of 11th Conference IOCV, Riverside: University of California. p.428-435, 1991.

GOUDET, J. **FSTAT version 2.9. 3.2. A program to estimate and test gene diversities and fixation indices.** Institut of Ecology, Lausanne, Switzerland. 1995.

GOTTWALD, T. R.; DA GRAÇA, J. V.; BASSANEZI, R. B. Citrus Huanglongbing: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress**, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1094/PHP-2007-0906-01-RV>>.

GOTTWALD, T. R. Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. **Annual Review Phytopathology**, v. 48, p. 119-139. 2010.

GUPTA, P. K.; ROY, J. K.; PRASAD, M. Single nucleotide polymorphisms (SNPs): a new paradigm in molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. **Current Science**, v. 80, n. 4. p. 524-535, 2001.

HALBERT, S. E.; MANJUNATH, K. L.; RAMADUGU, C.; BRODIE, M. W.; WEBB, S. E.; LEE, R. F. Trailers transporting oranges to processing plants move asian citrus psyllids. **Florida Entomologist**, v. 93, n. 1, 2010.

HALL, D. G.; RICHARDSON, M. L.; AMMAR, E.; HALBERT, S. E. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 146, p. 207–223, 2012.

HAUBOLD, B.; RAINEY, P. B. Genetic and ecotypic structure of a fluorescent *Pseudomonas* population. **Molecular Ecology**, v. 5, p. 747–761, 1996.

INOUE, H.; OHNISHI, J.; ITO, T.; TOMIMURA, K.; MIYATA, S.; IWANAMI, T.; ASHIHARA, W. Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. **Annals of Applied Biology**, v. 155, p. 29–36, 2009.

In silico simulation of molecular biology experiments. Disponível em: <<http://insilico.ehu.es/>> Acesso em: 16 fev. 2015.

ISLAM, Md.S.; GLYNN, J. M.; BAI Y.; DUAN Y.; COLETTA-FILHO H. D.; KURUBA G.; CIVEROLO E. L.; LIN, H. Multilocus microsatellite analysis of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' associated with citrus Huanglongbing worldwide. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 39, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-12-39>>.

JAGOUÉIX, E. S.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α -subdivision of the proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, p. 379-386, 1994.

JAGOUÉIX, E. S.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. Comparison of the 16S/23S ribosomal intergenic region of *Candidatus Liberobacter asiaticum* and *Candidatus Liberobacter africanum*, the two species associated with citrus huanglongbing (greening) disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 224-227, 1997.

KATOH, H.; SUBANDIYAH, S.; TOMIMURA K.; MITSURU OKUDA, M.; SU H-J.; IWANAMI T. Differentiation of "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" Isolates by Variable-Number Tandem-Repeat Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 1910–1917, 2011.

KATOH, H.; MIYATA, S-I.; INOUE, H.; IWANAMI, T. Unique Features of a Japanese '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' Strain Revealed by Whole Genome Sequencing. **PLoS ONE**, v. 9, ed. 9, e. 106109, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0106109>>.

KIMURA, M.; OHTA, T. Distribution of allelic frequencies in a finite population under stepwise production of neutral alleles. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 72, p. 2761-2764, 1975.

KISHI, L. T.; WICKERT, E.; LEMOS, E. G. M. Evaluation of *Xylella fastidiosa* genetic diversity by fAFLP markers. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p.202-208, 2008.

KOBORI, Y.; NAKATA, T.; OHTO, Y.; TAKASU, F. Dispersal of adult Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae), the vector of citrus greening disease, in artificial release experiments. **Applied Entomology and Zoology**, v. 46, p. 27–30, 2011.

LEE, I. M.; GUNDERSEN-RINDAL, D. E. BERTACCINI, A. Phytoplasma: ecology and genomic diversity. **Phytopathology**, v. 88, p. 1359-1366, 1998.

LEITE JÚNIOR, R. P. **Situação do HLB no Estado do Paraná, no Brasil e no Mundo**. Instituto Agrônômico do Paraná, 2014.

LENINGER, A. L. Biochemistry, **Worth Publishers**, New York, 2nd ed., 1975.

LEROY, T.; LEMAIRE, C.; DUNEMANN, F.; LE CAM, B. The genetic structure of a *Venturia inaequalis* population in a heterogeneous host population composed of different *Malus* species. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, 64p., 2013.

LISTA, F.; FAGGIONI, G.; VALJEVAC, S.; CIAMMARUCONI, A.; VAISSAIRE, J.; DOUJET, C.; GORGÉ, O.; SANTIS, R.; CARATTOLI, A.; CIERVO, A.; FASANELLA, A.; ORSINI, F.; D'AMELIO, R.; POURCEL, C.; CASSONE, A.; VERGNAUD, G. Genotyping of *Bacillus anthracis* strains based on automated capillary 25-loci multiple locus variable-number tandem repeats analysis. **BMC Microbiology**, v. 6, 33p., 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-6-33>>.

LOPES, S. A.; MARCUSSI, S.; TORRES, S. C. Z.; SOUZA, V.; FAGAN, C.; FRANÇA, S. C.; FERNANDES, N. G.; LOPES, J. R. S. Weeds as alternative hosts of the citrus, coffee, and plum strains of *Xylella fastidiosa* in Brazil. **Plant Disease**, v. 87, p. 544-549, 2003.

LOPES, S. A.; FRARE, G. F.; BERTOLINI, E.; CAMBRA, M.; FERNANDES, N. G.; AYRES, A. J.; MARIN, D. R.; BOVÉ, J. M. Liberibacter associated with citrus *huanglongbing* in Brazil: “*Candidatus* Liberibacter asiaticus” is heat tolerant, “*Ca. L. americanus*” is heat sensitive. **Plant Disease**, v. 93, n. 3, p. 257-263, 2009a.

LOPES, S. A.; BERTOLINI, E.; FRARE, G. F.; MARTINS, E. C.; WULFF, N. A.; TEIXEIRA, D. C.; FERNANDES, N. G.; CAMBRA, M. Graft transmission efficiencies and multiplication of “*Candidatus* Liberibacter americanus” and “*Ca. Liberibacter asiaticus*” in citrus plants. **Phytopathology**, v. 99, p. 301-306, 2009b.

LOUWS, F. J.; RADEMARKER, J. L. W.; BRUIJN, F. J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Reviews Phytopathology**, v. 37, p. 81-125, 1999.

LYNCH, M.; MILLIGAN, B. G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Molecular Ecology**, v. 3, p. 91-99, 1994.

MA, J.; AMOS, C. I. Principal Components Analysis of Population Admixture. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, e 40115, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0040115>>.

MACHADO, M. A.; LOCALI-FABRIS, E. C.; COLETTA-FILHO, H. D. *Candidatus Liberibacter* spp., agentes do *huanglongbing* dos citros. **Citrus Research & Technology**, v. 31, n. 1, p. 25-35, 2010.

MARENGO, S. **Mapeamento genético de Tangerina Sunki e *Poncirus Trifoliata* para resistência ao *Huanglongbing* (Greening) dos citros**. 2009. 75 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical. Área de concentração: Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) – Instituto Agrônomo, Campinas, 2009.

MARTÍNEZ, L. E.; CAVAGNARO, P. F.; MASUELLI, R. W.; ZÚÑIGA, M. SSR-based assessment of genetic diversity in South American *Vitis vinifera* varieties. **Plant Science**, v. 170, p. 1036–1044, 2006.

MATOS, L. A.; HILF, M. E.; CHEN, J.; FOLIMONOVA, S. Y. Validation of 'Variable Number of Tandem Repeat'-based approach for examination of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' diversity and its applications for the analysis of the pathogen populations in the areas of recent introduction, **PLoS ONE**, v. 8, ed. 11, e. 78994, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0078994>>.

McCLEAN, A. P. D.; OBERHOLZER, P. C. J. Citrus psylla, a vector of the greening disease of sweet orange. **South African Journal of Science**, v. 8, p. 297-298, 1965.

MEIRMANS, P. G.; van TIENDEREN, P. H. Genotype and Genodive: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. **Molecular ecology resources**, v. 4, n. 4, p. 792-794, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00770.x>>.

MURRAY, R. G. E.; SCHLEIFER, K. H. Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of procaryotes. **International journal of systematic bacteriology**, v. 44, p. 174–176, 1994.

MURRAY, M.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, p. 4321-4325, 1980.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 583-590, 1978.

NELSON, A. J.; ELIAS, K. S.; ARÉVALO, E. G.; DARLINGTON, L. C.; BAILEY, B. A. Genetic characterization by RAPD analysis of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *erythroxyli* associated with an emerging epidemic in Peru. **Phytopathology**, v. 87, n. 12, p. 1220-1225, 1997.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. O retrato da Citricultura Brasileira. **CitrusBR**. Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos, 2010.

OKUDA, M.; MATSUMOTO, M.; TANAKA, Y.; SUBANDIYAH, S.; IWANAMI, T. Characterization of the *tufB-secE-nusG-rplKAJL-rpoB* gene cluster of the citrus greening organism and detection by loop-mediated isothermal amplification. **Plant Disease**, v. 89, p. 705-711, 2005.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294-307. 2006.

OLIVEIRA, J. M. C. ***Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 E *Candidatus Liberibacter* spp: associação que coloca em risco a citricultura baiana: uma estimativa do impacto econômico**. 117 p. Dissertação (mestrado em Defesa Agropecuária) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, 2012.

PAIVA, S. R.; SILVÉRIO, V. C.; PAIVA, D. A. F.; Mc MANUS, C.; EGITO, A. A.; MARIANTE, A. S.; CASTRO, S. R.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; DERGAM, J. A. Origin of the main locally adapted sheep breeds of Brazil: A RFLP-PCR molecular analysis. **Archivos de Zootecnia**, v. 54, n. 206-207, p. 395-399, 2005.

PEAKALL R.; SMOUSE P. E. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537-2539, 2012.

PELZ-STELINSKI, K. S.; BRLANSKY, R. H.; EBERT, T. A.; ROGERS, M. E. Transmission parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 103, p. 1531–1541, 2010.

PEREIRA, F. M. V.; MILORI, D. M. B. P.; PEREIRA-FILHO, E. R.; VENÂNCIO, A. L.; RUSSO, M. de Sá T.; MARTINS, P. K.; FREITAS-ASTÚA, J. Fluorescence images combined to statistic test for fingerprinting of citrus plants after bacterial infection. **Analytical Methods**, v. 3, p. 552, 2011.

PINTO, F. O. **Associação de marcadores EST-SSR à resistência ao bichomineiro em cafeeiros**. 2006. Dissertação (mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical, Área de Concentração em Melhoramento Genético Vegetal) - Instituto Agrônomo, Campinas, 2006.

REDAK, R. A.; PURCELL, A. H.; LOPES, J. R. S.; BLUA, M. J.; MIZELL, R. F.; ANDERSEN, P. C. The biology of xylem fluid feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. **Annual Review of Entomology**, v. 49, p. 243-270, 2004.

RESTREPO, S.; VE´LEZ, C. M.; VERDIER, V. Measuring the genetic diversity in *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* within different fields in Colombia. **Phytopathology**, v. 90, p. 683–690, 2000.

RESTREPO, S.; VE´LEZ, C. M.; DUQUE, M. C.; VERDIER, V. Genetic Structure and Population Dynamics of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia from 1995 to 1999. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 255-261, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.1.255-261.2004>>.

SÃO PAULO (Estado). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Gabinete do Ministro. **Instrução Normativa Nº 53, de 23 de Outubro de 2013**. São Paulo, 2013, 33 p.

SAUER, A. V.; ZANUTTO, C. A.; NOCCHI, P. T. R.; MACHADO, M. A.; BOCK, C.; NUNES, W. M. C. Seasonal variation in populations of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in citrus trees in Paraná state, Brazil. **Plant Disease**, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-09-14-0926-RE>>.

SCHOOLS, L. M.; van der ENDE, A.; DAMEN, M.; van de POL, I. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of *Neisseria meningitidis* yields groupings similar to those obtained by multilocus sequence typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1509–1518, 2006.

SUBANDIYAH, S.; IWANAMI, T.; TSUYUMU, S.; IEKI, H. Comparison of 16S rDNA and 16S/23S intergenic region sequences among citrus greening organisms in Asia. **Plant Disease**, v. 84, p. 15-18, 2000.

TEIXEIRA, D. C.; DANE, J. L.; SAILLARD, C.; EVEILLARD, S.; DANET, J. L.; AYRES, A. J.; BOVÉ, J. M. *Candidatus Liberibacter americanus* associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. **International Journal of Systematic Evolution Microbiology**, v. 55, p. 1857-1862, 2005a.

TEIXEIRA, D. C.; AYRES, A. J.; KITAJIMA, E. W.; TANAKA, F. A. O.; DANET, J. L.; JAGOUEIX-EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J. M. First report of a Huanglongbing-like disease of Citrus in Sao Paulo State, Brazil, and association of a new Liberibacter species, "*Candidatus Liberibacter americanus*", with the disease. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, p. 107, 2005b.

TOMIMURA, K.; MIYATA, S.; FURUYA, N.; KUBOTA, K.; OKUDA, M.; SUBANDIYAH, S.; HUNG, T. H.; JI, H.; IWANAMI, T. Evaluation of genetic diversity among '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' isolates collected in Southeast Asia. **Phytopathology**, v. 99, n. 9, p. 1062-1069, 2009.

TORRES, S. C. Z. **Tentativas de isolamento de liberibacter e análise de populações bacterianas em plantas de citros afetadaspor huanglongbing**. 42 f. Dissertação (mestrado em Biotecnologia aplicada à saúde) - Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP, Ribeirão Preto, 2008.

TÓTH, G.; GÁSPARI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. **Genome Research**, v. 10, p. 967-981, 2000.

TROGGIO, M.; MALACARNE, G.; COPPOLA, G.; SEGALA, C.; CARTWRIGHT, D. A.; PINDO, M.; STEFANINI, M.; MANK, R.; MOROLDO, M.; MORGANTE, M.; GRANDO, M. S.; VELASCO, R. A Dense Single-Nucleotide Polymorphism-Based Genetic Linkage Map of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Anchoring Pinot Noir Bacterial Artificial Chromosome Contigs. **Genetics**, v. 176, p. 2637–2650, 2007.

VAN BELKUM, A.; SCHERER, S.; VAN ALPHEN, L.; VERBRUGH, H. Short-Sequence DNA Repeats in Prokaryotic Genomes. **Microbiology and Molecular Biology reviews**, v. 62, n. 2, p. 275–293, 1998.

WAPLES, R. S.; GAGGIOTTI, O. E. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 1419-1439, 2006.

WILMINGTON, D. **Thermo Fisher Scientific - NanoDrop products**. USA, 2015. Disponível em: <<http://www.nanodrop.com/>> Acesso em: 05 abr. 2015.
WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, p. 323-354, 1951.

YU, K.; PARK, S. J.; POYSA, V. Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*). **Genome**, v. 42, p. 27-34, 1999.

YUAN, X.; MORANO, L.; BROMLEY, R.; SPRING-PEARSON, S.; STOUTHAMER, R.; NUNNEY, L. Multilocus Sequence Typing of *Xylella fastidiosa* causing Pierce's disease and oleander leaf scorch in the United States. **American Phytopathological Society**, v. 100, n. 6, p. 601-611, 2010.

ZHAN, J.; PETTWAY, R. E.; McDONALD, B. A. The global genetic structure of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* is characterized by high nuclear diversity, low mitochondrial diversity, regular recombination, and gene flow. **Fungal Genetics and Biology**, v. 38, p. 286–297, 2003.

ZHOU, L.; POWELL, C. A.; HOFFMAN, M. T.; LI, W.; FAN, G.; LIU, B.; LIN, H.; DUAN, Y. Diversity and plasticity of the intracellular plant pathogen and insect symbiont "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" as revealed by hypervariable prophage genes with intragenic tandem repeats. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 18, p. 6663–6673, 2011.