

MICHELE FERNANDA SOUZA DUTRA

**AVALIAÇÃO DE GENES PARA O CONTROLE DO HUANGLONGBING,
OBTENÇÃO DE LARANJEIRAS-DOCES GENETICAMENTE MODIFICADAS E
GENOMA COMPLETO DE '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' DO BRASIL**

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutora em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Nelson Arno Wulff
Co-orientadora: Dra. Priscila Alves da Silva

Araraquara
2024

D978a	Dutra, Michele Fernanda Souza Avaliação de genes para o controle do Huanglongbing, obtenção de laranjeiras-doces geneticamente modificadas e genoma completo de 'Candidatus Liberibacter asiaticus' do Brasil / Michele Fernanda Souza Dutra. -- Araraquara, 2024 182 f. : il. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara Orientador: Nelson Arno Wulff Coorientadora: Priscila Alves da Silva 1. Citrus. 2. Agentes antibacterianos. 3. Plantas transgênicas. 4. Genoma. 5. Fago. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Pesquisas voltadas para a obtenção de laranjeiras-doces resistentes a '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' tornam-se de extrema importância no atual contexto da citricultura global, que enfrenta desafios significativos devido ao Huanglongbing dos citros. Tanto o estudo de potenciais genes tóxicos em modelos, como a compreensão do genoma desse patógeno são cruciais. Este trabalho abordou investigações sobre a toxicidade de genes de '*Candidatus Liberibacter*', incluindo genes de seus profagos, expressos em laranjeiras-doces geneticamente modificadas (GM) e testados contra esses patógenos. Embora não tenham sido observados efeitos imediatos nos títulos dessas bactérias, esses genes, podem desempenhar um papel fundamental em pesquisas futuras para a obtenção desses produtos em maiores quantidades e em tecidos específicos, favorecendo a biodisponibilidade. Além disso, destaca-se a conquista da obtenção do primeiro genoma completo de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' do Brasil, o que proporcionou a realização de uma avaliação genética da população predominante no país. Como uma peça crucial na produção de citros, o Brasil dá um passo importante no desvendamento desse patógeno, oferecendo insights valiosos sobre sua plasticidade. Essas descobertas têm o potencial de orientar pesquisas futuras, contribuindo para estratégias mais eficazes de manejo do HLB e fortalecendo a segurança e produtividade da citricultura no país e no mundo.

POTENCIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

Research aimed at obtaining sweet orange trees resistant to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' becomes of utmost importance in the current context of global citriculture, which faces significant challenges due to Huanglongbing. Both the study of potential toxic genes in model systems and the understanding of the genome of this pathogen are crucial. This study addressed investigations into the toxicity of genes from '*Candidatus Liberibacter*', including those from prophages, expressed in genetically modified sweet orange trees and tested against these pathogens. Although no immediate effects were observed on the titers of these bacteria, these genes may play a fundamental role in future research to obtain these products in larger quantities and in specific tissues, favoring bioavailability. Furthermore, the achievement of obtaining the first complete genome of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in Brazil is noteworthy, allowing for a genetic assessment of the predominant population in the country. As a crucial piece in citrus production, Brazil takes an important step in unraveling this pathogen, providing valuable insights into its plasticity. These findings have the potential to guide future research, contributing to more effective HLB management strategies and strengthening the safety and productivity of citrus cultivation in the country and globally.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DE GENES PARA O CONTROLE DO HUANGLONGBING, OBTENÇÃO DE LARANJEIRAS-DOCES GENETICAMENTE MODIFICADAS E GENOMA COMPLETO DE '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' DO BRASIL

AUTORA: MICHELE FERNANDA SOUZA DUTRA

ORIENTADOR: NELSON ARNO WULFF

COORIENTADORA: PRISCILA ALVES DA SILVA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. NELSON ARNO WULFF (Participação Presencial)

Departamento Científico, Departamento de Pesquisa & Desenvolvimento / Fundo de Defesa da Citricultura - FUNDECITRUS - Araraquara

Profa. Dra. MARIA CELIA BERTOLINI (Participação Presencial)

Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. JESUS APARECIDO FERRO (Participação Presencial)

Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental / FCAV UNESP Jaboticabal

Profa. Dra. ANDREA SOARES DA COSTA FUENTES (Participação Presencial)

Departamento de Genética e Evolução / Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)

Dr MATEUS DE ALMEIDA SANTOS (Participação Presencial)

Laboratório de Biotecnologia Vegetal / Fundo de Defesa da Citricultura - FUNDECITRUS - Araraquara/SP

Araraquara, 16 de janeiro de 2024

DADOS CURRICULARES

Nome: Michele Fernanda Souza Dutra

Nome em citação Bibliográfica: DUTRA, M. F. S.; Dutra, MFS

Endereço profissional: Fundo de Defesa da Citricultura – FUNDECITRUS. Av. Dr. Adhemar Pereira de Barros, 201 – Araraquara/SP, CEP 14807-040

E-mail: msfdutra@gmail.com

- **Formação acadêmica**

Mestre em Biotecnologia (2018)

Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química - Araraquara.

Título: Análise funcional de genes de *Candidatus Liberibacter asiaticus*, bactéria associada ao Huanglongbing dos citros

Orientador: Prof. Dr. Nelson Arno Wulff

Bolsista CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

MBA em Gestão da Qualidade e Produtividade Empresarial (2017)

Centro Universitário de Lins (Unilins)

Graduação em Tecnologia em Processos Químicos (2015)

Centro Universitário de Lins (Unilins)

(Prêmio Bolsa 100% Melhor Aluna do Curso de Tecnologia em Processos Químicos, turma 2015)

- **Trabalhos recentes apresentados em congressos nacionais**

DUTRA, M. F. S.; SILVA, P. A.; WULFF, N. A. Heterologous expression of *Candidatus Liberibacter* spp. genes with potential role in bacterial competition. In: 2nd Xanthomeeting: plant Pathogens, antimicrobial agents, disease management and control. São Paulo- SP. 2018

- **Trabalhos recentes apresentados em congressos internacionais**

DAROLT, J. C.; DUTRA, M. F. S.; SANCHES, B. C. P.; WULFF, N. A. Relative expression of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' prophage regions targets on psyllids and sweet orange trees with single and double infection. In: 67th Brazilian Congress of Genetics, Natal-RN. 2022.

DUTRA, M. F. S.; SILVA, P. A.; MARTINS, E. C.; DAROLT, J. C.; WULFF, N. A. A Colicin-like bacteriocin and a lysozyme and their activities against '*Escherichia coli*' and '*Candidatus Liberibacter*' species. In: 67th Brazilian Congress of Genetics, Natal-RN. 2022.

SANCHES, B. C. P.; DUTRA, M. F. S.; MARTINS, E. C.; CRUSCA, E.; MARCHETTO, R.; WUFF, N. A. Prospection of peptides with antibacterial and inducer of vegetal defense system activities against Huanglongbing. In: 67th Brazilian Congress of Genetics, Natal-RN. 2022.

- **Participação em eventos científicos**

67th Brazilian Congress of Genetics. Natal – RN. 2022. (Congresso).

51º Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Recife – PE. 2019. (Congresso).

7º ENCITRUS: Encontro Técnico e Científico de Citros. Araraquara – SP. 2019. (Encontro).

2nd *Xanthomeeting*. São Paulo – SP. 2018. (Simpósio).

- **Palestras e minicursos ministrados**

A tecnologia do DNA recombinante e seu uso no tratamento de doenças e desenvolvimento de vacinas – II Congresso Brasileiro de Bioquímica Humana – On line (Palestra, carga horária: 1h). 2022.

Opções de pós-graduação: do mestrado profissional ao stricto sensu - Jornada Biotecnologia Brasil – On line. (Palestra, carga horária: 1h). 2021.

Biologia Sintética na Produção de Proteínas Recombinantes - I Simpósio Biotecnologia Brasil – Edição Biologia Sintética – On line. (Minicurso, carga horária: 6h). 2020.

Citrus: história, doenças e estratégias de controle - Curso de Graduação em Engenharia Agrônômica - Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium (Unisalesiano). Lins – São Paulo. (Palestra, carga horária: 5h). 2020.

Biotecnologia aliada ao desenvolvimento tecnológico e suas aplicações - 19º CONECTE (Congresso de Educação Ciência e Tecnologia) - Centro universitário de Lins (UNILINS). Lins – São Paulo. (Palestra, carga horária: 1h). 2018.

- **Formação complementar**

From Gene to Trait: an introduction to an advanced biotechnology pipeline. Genomics for Climate Change Research Center (GCCRC), Campinas – São Paulo (curso, carga horária: 30 horas). 2023.

Aspectos Bioquímicos e Moleculares da Indução de Resistência em Plantas a Patógenos. CBAB (Centro Brasil-Argentina de Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis – SC. (curso, carga Horária: 90 horas). 2018.

- **Outros**

DUTRA, M. F. S.; ALVES, M. N.; DAROLT, J. C.; JULIAO, M. H. M.; SANCHES, B. C. P. Extração, quantificação e análise de ácidos nucleicos de diferentes materiais. 2022. XVI Curso de Inverno de Genética. Unesp/ FCAV – Jaboticabal, SP. (Curso ministrado, 20h).

*Àquela pequenina que um dia sonhou
em ser cientista, e*

*À minha querida avó, Maria Luzia,
que sempre foi minha luz,*

Dedico!

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre me guiar em meus passos e ao Universo por conspirar a favor dos desejos do meu coração.

Ao Dr. Nelson Arno Wulff, pela confiança a mim depositada, valorosa orientação e contribuição para minha carreira como cientista.

À minha amada família: avó Dona Luzia, pai Adriano, tias Cassilda, Izabel e Zilda, mãe Diana, Sabryna e Suely, irmãs Raphaela e Maria, tio Luiz e primo Geovane. Obrigada por sempre me incentivarem a correr atrás dos meus sonhos.

Ao meu namorado, meu bem, Rodrigo, pelo amor, carinho, apoio, compreensão e por tornar os meus dias mais leves.

Ao Óreo por ser tão especial e animar meus dias.

À minha querida sogra Célia, às tias Soeli, Marta e Vera, ao tio Guido, Tiago, Tobias e Aron, pela companhia nos maravilhosos domingos.

Às queridas amigas Helo, Moni, Josi e Bia, por todo o carinho, as conversas, os desabafos e o suporte. Desejo a todos que possam ter amigas tão iluminadas e maravilhosas quanto vocês.

À Pri Alves, pelos conselhos, amizade, valorosa co-orientação e pela parceria nos projetos.

Aos amigos do laboratório que me deram suporte técnico: Elaine, Juan, Jaci, Tami, Afrânio, Tati, Dani Coletti, Deivdson, Sidnei, Jean, Pedro, Vanessa, Letícia, Haroldo e sua equipe, Michele, Eliane, Dani Runho, Ana, Mateus, André e sua equipe, e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Fundecitrus, por todo o suporte financeiro e estrutura para que esse trabalho pudesse ser desenvolvido.

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

*Quando você quer alguma coisa, todo o universo
conspira para que você realize o seu desejo.*

-O Alquimista, Paulo Coelho

AVALIAÇÃO DE GENES PARA O CONTROLE DO HUANGLONGBING, OBTENÇÃO DE LARANJEIRAS-DOCES GENETICAMENTE MODIFICADAS E GENOMA COMPLETO DE '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' DO BRASIL

RESUMO

O Huanglongbing (HLB), doença associada às bactérias não cultiváveis '*Candidatus Liberibacter*', se configura como a doença mais destrutiva dos citros mundialmente. Não há cura e não existem citros comerciais resistentes ao HLB. O manejo é feito com o plantio de mudas sadias, a inspeção e a erradicação de plantas sintomáticas e o monitoramento e controle do inseto vetor. A obtenção do genoma das liberibactérias proporcionou descobertas valiosas, destacando a presença de genes associados à lise, como lisozimas, e genes de profagos que foram anotados como possíveis bacteriocinas. No presente trabalho, as lisozimas associadas a profago ED07_RS0204515 isolado 'Ca. *Liberibacter asiaticus*' (CLas) 3PA e CLIBASIA_04790 isolado 4PA, além das possíveis bacteriocinas SC1_gp060 isolados Poona e 2PA e lam_678 do isolado 'Ca. *L. americanus*' (CLam) São Paulo, foram obtidas em células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS e utilizadas em sistema de expressão heteróloga. A expressão de lisozima e algumas formas da bacteriocina impediu de forma significativa o crescimento de células de *E. coli* BL21 em meio líquido e sólido quando comparadas com os controles, com destaque para ED07_RS0204515 e SC1_gp060 Poona. Laranjeiras geneticamente modificadas foram obtidas expressando a lisozima ED07_RS0204515 e as bacteriocinas SC1_gp060 e lam_678, sob o comando do promotor *AtSUC2* e 35S CaMV. Os níveis de expressão dos transgenes foram significativos, no entanto, não houve efeito aparente sob os títulos de CLas e CLam quando as plantas foram desafiadas frente a esses patógenos no sistema proposto. Ainda assim, pelo resultado obtido em células de *E. coli*, as lisozimas e bacteriocina estudadas no presente trabalho são potenciais para uso como agentes antibacterianos. Por outro lado, o primeiro genoma completo de um isolado de CLas do Brasil, denominado de 9PA, foi obtido. Tal fato permitiu a comparação do genoma deste isolado com os demais disponíveis, revelando Regiões Genômicas Hiper Variáveis (HGRs). A inferência de distâncias genéticas e as investigações sobre essas HGRs presentes nas populações de campo pontuaram que o isolado 9PA se assemelha a isolados das Américas e China, e se configura como um dos três tipos de isolados de maior predominância em campo no Brasil. Adicionalmente, constatou-se a presença do profago tipo 1, P-9PA-1, tanto nas formas integrada ao genoma e na forma de plasmídeo circular. Os resultados apresentados ressaltam características relevantes para o desenvolvimento de estratégias que visam o controle de liberibactérias patogênicas.

Palavras-Chave: Citrus, agentes antibacterianos, plantas transgênicas, genoma, fago.

EVALUATION OF GENES FOR HUANGLONGBING CONTROL, OBTANTION OF GENETICALLY MODIFIED SWEET ORANGE TREES, AND THE COMPLETE GENOME OF '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' FROM BRAZIL

ABSTRACT

Huanglongbing (HLB), a disease associated with the non-cultivable bacteria '*Candidatus Liberibacter*,' stands out as the most destructive citrus disease worldwide. There is no cure, and there are no commercially resistant citrus varieties to HLB. Management involves planting healthy seedlings, inspecting and eradicating symptomatic plants, and monitoring and controlling the vector insect. The sequencing of the liberibacteria genomes has yielded valuable discoveries, highlighting the presence of genes associated with lysis, such as lysozymes, and prophage genes annotated as potential bacteriocins. In this study, lysozymes associated with prophage ED07_RS0204515 from '*Ca. Liberibacter asiaticus*' (CLas) 3PA and CLIBASIA_04790 from isolate 4PA, as well as possible bacteriocins SC1_gp060 from strains Poona and 2PA, and lam_678 from '*Ca. L. americanus*' (CLam) São Paulo strain, were obtained in *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS cells and used in a heterologous expression system. The expression of lysozyme and certain forms of bacteriocin significantly inhibited the growth of *E. coli* BL21 cells in both liquid and solid media compared to controls, with ED07_RS0204515 and SC1_gp060 Poona standing out. Genetically modified orange trees expressing lysozyme ED07_RS0204515 and bacteriocins SC1_gp060 and lam_678 under the control of the AtSUC2 and 35S CaMV promoters were obtained. The transgene expression levels were significant; however, there was no apparent effect on CLas and CLam titers when plants were challenged with these pathogens in the proposed system. Nevertheless, based on the results obtained in *E. coli* cells, the lysozymes and bacteriocins studied in this work show potential for use as antibacterial agents. On the other hand, the first complete genome of a CLas isolate from Brazil, named 9PA, was obtained. This allowed the comparison of this isolate's genome with others available, revealing Hyper Variable Genomic Regions (HGRs). Genetic distance inference and investigations into these HGRs in field populations indicated that the 9PA isolate resembles isolates from the Americas and China, representing one of the three most predominant types of isolates in Brazil. Additionally, the presence of prophage type 1, P-9PA-1, was observed both in integrated form within the genome and as a circular plasmid. The presented results emphasize relevant characteristics for the development of strategies aiming at the control of pathogenic liberibacteria.

Keywords: Citrus, antibacterial agents, transgenic plants, genome, phage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sintomas típicos do Huanglongbing.....	22
Figura 2. Percentual (%) de laranjeiras-doces com incidência de sintomas de HLB.....	23
Figura 3. Microscopia de ‘ <i>Candidatus Liberibacter</i> ’ em células hospedeiras.....	24
Figura 4. Proporção das espécies de ‘ <i>Candidatus Liberibacter</i> ’ e fitoplasmas presentes em amostras foliares enviadas por citricultores ao Fundecitrus para diagnóstico do Huanglongbing	25
Figura 5. Estágios do psíldeo <i>Diaphorina citri</i> , de ninfas até adulto.....	29
Figura 6. Cinética de crescimento (A) e Área Abaixo da Curva do Progresso da Densidade Óptica (B) de células de <i>E. coli</i> BL21 expressando colicinas SC1_gp060 2PA, SC1_gp060 Poona e lam_678.....	50
Figura 7. Cinética de crescimento (A) e Área Abaixo da Curva do Progresso da Densidade Óptica (B) de células de <i>E. coli</i> BL21 expressando lisozimas ED07_RS0204515 e CLIBASIA_04790.....	51
Figura 8. Diluição seriada (10^{-1} a 10^{-12}) de culturas de <i>Escherichia coli</i> BL21 transformadas com pET28a, pMD18, pMD13, pMD16, pMD14, pMD15 e pMD17.....	53
Figura 9. SDS-PAGE e Western-Blot do conteúdo proteico total de células de <i>Escherichia coli</i> BL21 produzindo (A) SC1_gp060 2PA (pMD13), (B) SC1_gp060 Poona (pMD16) e (C) lam_678 (pMD14).....	55
Figura 10. SDS-PAGE e Western-Blot do conteúdo proteico total de células de <i>Escherichia coli</i> BL21 produzindo (A) CLIBASIA_04790 (pMD15) e (B) ED07_RS0204515 (pMD17).....	56
Figura 11. Alinhamento das sequências de aminoácidos de SC1_gp060 Poona, CLas 2PA e CLas UF506 (SC1_gp60).....	57
Figura 12. Predição de possíveis sítios de clivagem para a colicina SC1_gp060 2PA	58
Figura 13. Alinhamento dos resíduos de aminoácidos relativos à região do possível sítio de clivagem e sequência presente somente em SC1_gp060 2PA.....	58
Figura 14. Domínio conservado das proteínas SC1_gp060 Poona e SC1_gp060 2PA.....	59
Figura 15. Predição de estrutura terciária (3D) de SC1_gp060 2PA e SC1_gp060 Poona.....	60
Figura 16. Domínio conservado (A) e Predição de estrutura terciária (3D) (B) de lam_678.....	61
Figura 17. Alinhamento de resíduos (A) e predição de estrutura terciária (B) das lisozimas CLIBASIA_04790 e ED07_RS0204515.....	62
Figura 18. Western-Blot do precipitado de células (P) e sobrenadante (S) de cultura de células de <i>Escherichia coli</i> BL21 expressando SC1_gp060 Poona (A) e ED07_RS0204515 (B)	63

Figura 19. Perfil de amplificação da PCR de ED07_RS0204515 com códons otimizados.....	96
Figura 20. Perfil de clivagem de MD26 com <i>DraI</i> para confirmação de obtenção do vetor binário	97
Figura 21. Representação esquemática da região do T-DNA das construções PAS2 (A), PAS3 (B) e MD26 (C) obtidas pelo sistema Golden Braid.....	97
Figura 22. Perfil de clivagem de MD26 e pROKII com a enzima <i>Bam</i> HI.....	98
Figura 23. Perfil de clivagem de MD26 e pROKII com as enzimas <i>AcI</i> I e <i>Cla</i> I.....	98
Figura 24. Representação esquemática da obtenção do vetor binário MD29 por clivagem enzimática e ligação.....	99
Figura 25. Perfil de amplificação via PCR de MD29 a partir de colônias de <i>E. coli</i> JM109.....	99
Figura 26. Representação esquemática da região do T-DNA da construção MD29.....	99
Figura 27. Perfil de amplificação via PCR utilizando DNA plasmidial extraído a partir de colônias de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> transformadas com as construções PAS2, PAS3, MD26 e MD29.....	100
Figura 28. Perfil de amplificação via PCR utilizando DNA extraído de folhas de laranja-doce transformadas com o plasmídeo PAS2.....	102
Figura 29. Perfil de amplificação via PCR utilizando DNA extraído de folhas de laranja-doce transformadas com o plasmídeo PAS3.....	102
Figura 30. Perfil de amplificação via PCR utilizando DNA extraído de folhas de laranja-doce transformadas com o plasmídeo MD26.....	103
Figura 31. Perfil de amplificação via PCR utilizando DNA extraído de folhas de laranja-doce transformadas com o plasmídeo MD29.....	103
Figura 32. Southern-blot para avaliação do número de cópias e integridade dos eventos de PAS2.....	104
Figura 33. Southern-blot para avaliação de integridade e do número de cópias dos eventos de MD26.....	105
Figura 34. Expressão gênica relativa do transgene SC1_gp060 nas matrizes dos eventos PAS2 em laranja-doce Pera.....	106
Figura 35. Expressão gênica relativa do transgene ED07_RS0204515 nos eventos MD26 em laranja-doce Pera e Valencia.....	107
Figura 36. Análise fenotípica dos eventos PAS2 em laranja doce Pera.....	108
Figura 37. Análise fenotípica dos eventos MD26 em laranja doce Pera e Valencia.....	109
Figura 38. Porcentagem de detecção (A) e títulos médios (B) de CLas nas propagações dos eventos P-PAS2-1, P-PAS2-2 e P-PAS2-3.	111
Figura 39. Porcentagem de detecção (A) e títulos médios (B) de CLam nas propagações dos eventos P-PAS2-1, P-PAS2-2 e P-PAS2-3.	113
Figura 40. Porcentagem de detecção de CLas em eventos MD26.....	115
Figura 41. Títulos médios de CLas nas propagações dos eventos MD26.....	116

Figura 42. Expressão relativa do transgene SC1_gp060 dirigido pelo promotor AtSUC2 em plantas de laranja-doce dos eventos PAS2 infectadas com CLas e sadias.....	117
Figura 43. Título de CLas nos eventos avaliados quanto a expressão gênica.....	118
Figura 44. Mapa do estado de São Paulo ilustrando a localização geográfica da coleta das amostras de CLas utilizadas para análise de variabilidade molecular.....	140
Figura 45. Representação esquemática do genoma do isolado 9PA de CLas	144
Figura 46. Árvore filogenética de 13 isolados de CLas.....	146
Figura 47. Análise de BLASTn para detectar a presença do CLasMV1 nos genomas de CLas, identificado como HGR_M.....	150
Figura 48. Classificação das 68 amostras de isolados de campo e amostras de controle de CLas.....	151
Figura 49. Representação esquemática das formas circulares dos profagos P-9PA-1 (A) e P-9PA-3 (B).....	153
Figura 50. Organização dos profagos P-9PA-1 e P-9PA-3 no genoma do isolado 9PA.....	154
Figura 51. Mapa de alinhamento genômico que mostra as semelhanças entre os profagos do isolado 9PA de CLas com SC1 de UF506 e P-JXJC-3 de JXGC.....	157

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos vetores e construções gênicas	45
Tabela 2. Lista de hits de domínios conservados para SC1_gp060 2PA, SC1_gp060 Poona e lam_678.....	59
Tabela 3. Descrição de vetores e módulos gênicos <i>Golden Braid</i>	79
Tabela 4. Descrição das construções <i>Golden Braid</i>	80
Tabela 5. Primers utilizados para confirmação de inserção do T-DNA contendo os transgenes SC1_gp060 (PAS2) lam_678 (PAS3) e ED07_RS0204515 (MD26/ MD29) em eventos GM de laranjeiras-doces.....	88
Tabela 6. Laranjeiras-doces GM dos eventos PAS2, MD26 e controles propagadas e desafiadas contra CLas e CLam.....	94
Tabela 7. Eventos de transformação genética de laranjeira-doce das variedades Pera e Valencia, obtidos a partir das construções genéticas PAS2, PAS3 e MD26.....	101
Tabela 8. Isolados de CLas utilizados no alinhamento de genoma completo.....	138
Tabela 9. Primers utilizados para amplificação das HGRs na população de CLas.....	139
Tabela 10. Primers utilizados para verificação de integração dos profagos no genoma de 9PA.....	142
Tabela 11. Primers e características das HGRs.....	147

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	20
A IMPORTÂNCIA E OS DESAFIOS DA CITRICULTURA BRASILEIRA.....	20
1 INTRODUÇÃO À CITRICULTURA BRASILEIRA.....	20
2 HUANGLONGBING (HLB).....	20
3 EPIDEMIOLOGIA DO HLB.....	23
3.1 Liberibactérias.....	23
3.1.2 Profagos em Liberibactérias.....	26
3.2 Psíldeo <i>Diaphorina citri</i>	28
4 PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS PARA MANEJO DO HLB.....	29
5 DESAFIOS FUTUROS E PERSPECTIVAS	30
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
CAPÍTULO 2	40
INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE POTENCIAIS BACTERIOCINAS (SC1_gp060 E lam_678) E LISOZIMAS (CLIBASIA_04790 E ED07_RS0204515) POR EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM <i>Escherichia coli</i>	40
RESUMO.....	40
ABSTRACT.....	41
1 INTRODUÇÃO.....	42
2 OBJETIVOS.....	44
2.1 Objetivo geral.....	44
2.2 Objetivos específicos	44
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1 Microrganismos, vetores de expressão, meios de cultura e condições de cultivo.....	45
3.2 Atividade antibacteriana das potenciais bacteriocinas e lisozimas em células de <i>Escherichia coli</i> BL21.....	46
3.2.1 Expressão heteróloga de SC1_gp060, lam_678, CLIBASIA_04790 e ED07_RS0204515 em meio líquido.....	46
3.2.2 Indução e repressão da expressão heteróloga de SC1_gp060 e ED07_RS0204515 em meio sólido.....	47
3.3 Ensaio de secreção de SC1_gp060 e ED07_RS0204515 em <i>Escherichia coli</i>	47
3.4 Análises de Bioinformática.....	48
4 RESULTADOS.....	49
4.1 Atividade antibacteriana de SC1_gp060, lam_678, CLIBASIA_04790 e ED07_RS0204515 em células de <i>Escherichia coli</i>	49
4.2. Identificação de SC1_gp060, lam_678, CLIBASIA_04790 e ED07_RS0204515 por Western-blot.....	54
4.3 Análises de bioinformática das bacteriocinas de CLas e CLam.....	56

4.4 Análises de bioinformática das lisozimas CLIBASIA_04790 e ED07_RS0204515.....	61
4.5 Ensaio de secreção de SC1_gp060 e ED07_RS0204515 em <i>Escherichia coli</i>	62
5 DISCUSSÃO.....	64
6 CONCLUSÕES.....	68
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
CAPÍTULO 3.....	73
BACTERIOCINAS E LISOZIMA COMO POTENCIAIS AGENTES DE CONTROLE DE LIBERIBACTÉRIAS EM LARANJEIRAS-DOCES MEDIANTE EXPRESSÃO ECTÓPICA.....	73
RESUMO.....	73
ABSTRACT.....	74
1 INTRODUÇÃO.....	75
2 OBJETIVOS.....	77
2.1 Objetivo geral.....	77
2.2 Objetivos específicos	77
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	78
3.1 Obtenção do cassete de expressão de ED07_RS0204515 em sistema <i>Golden Braid</i>	78
3.1.1 Otimização de códons e síntese de ED07_RS0204515.....	80
3.1.2 Amplificação via PCR e domesticação de ED07_RS0204515 em pUPD2.....	80
3.1.3 Obtenção da unidade transcricional e do vetor binário	81
3.2 Obtenção de um vetor binário como alternativa ao sistema <i>Golden Braid</i>	82
3.3 Transformação em <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	83
3.4 Transformação genética de tecido adulto e obtenção de laranjeiras-doces GM.....	85
3.4.1 Preparo do inóculo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	85
3.4.2 Preparo e infecção dos explantes.....	86
3.4.3 Co-cultivo e regeneração das gemas.....	86
3.4.4 Microenxertia e confirmação de gemas GM.....	87
3.5 Southern-Blot.....	88
3.6 Propagações e manutenção de laranjeiras-doces	89
3.7 Análise de expressão gênica relativa dos transgenes em laranjeiras-doces GM.....	90
3.7.1 Extração do RNA total.....	90
3.7.2 Tratamento com DNase e Síntese do cDNA.....	91
3.7.3 Quantificação e análise de expressão gênica via RT-qPCR.....	91
3.8 Análise fenotípica.....	92
3.9 Desafio de laranjeiras-doces GM frente a CLas e CLam.....	93
3.9.1 Inoculações de CLas e CLam em propagações do evento PAS2.....	93
3.9.2 Detecção e quantificação do título de CLas e CLam em laranjeiras-doces GM expressando SC1_gp060 e ED07_RS0204515.....	94

3.9.3 Quantificação da expressão gênica de SC1_gp060 em eventos de Laranjeiras-doces sob regulação do promotor AtSUC2 em resposta a infecção por CLas.....	95
4 RESULTADOS	96
4.1 Obtenção do cassete de expressão de ED07_RS0204515 em sistema Golden Braid.....	96
4.2 Obtenção de um vetor binário como alternativa ao sistema Golden Braid....	98
4.3 Obtenção de laranjeiras-doces GM expressando SC1_gp060 e ED07_RS020515.....	100
4.4 Southern blot.....	104
4.5 Análise de expressão gênica relativa dos transgenes em laranjeiras-doces GM.....	105
4.6 Análise fenotípica.....	107
4.7 Laranjeiras-doces GM expressando SC1_gp060 inoculadas com CLas e CLam.....	110
4.7.1 Título bacteriano de CLas e porcentagem de plantas infectadas.....	110
4.7.2 Título bacteriano de CLam e porcentagem de plantas infectadas.....	112
4.8 Laranjeiras-doces GM expressando ED07_RS0204515 inoculadas com CLas.....	114
4.9 Quantificação da expressão gênica de SC1_gp060 em eventos de laranjeiras-doces GM sob regulação do promotor AtSUC2 em resposta a infecção por CLas.....	117
5 DISCUSSÃO.....	119
6 CONCLUSÕES.....	125
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126
CAPÍTULO 4.....	131
GENOMA COMPLETO DO ISOLADO 9PA DE ‘<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>’ E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS PREVALENTES NA CITRICULTURA BRAZILEIRA	131
RESUMO.....	131
ABSTRACT.....	132
1 INTRODUÇÃO.....	133
2 OBJETIVOS.....	135
2.1 Objetivo geral.....	135
2.2 Objetivos específicos.....	135
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	136
3.1 Fechamento de gaps entre <i>contigs</i> no genoma de 9PA usando a reação em cadeia da polimerase PCR.....	136
3.2 Montagem e anotação do genoma.....	137
3.3 Alinhamento de genoma completo de isolados de CLas.....	138
3.4 Amostragem para análise de variabilidade molecular.....	139
3.5 Análise de variabilidade molecular da população de CLas em São Paulo.....	141
3.6 Caracterização dos profagos.....	141
4 RESULTADOS.....	143

4.1 Fechamento de gaps, montagem e características gerais do genoma de 9PA.....	143
4.2 Comparação entre genomas de isolados de CLas.....	145
4.3 Ocorrência de seis HGRs em isolados de CLas do campo no estado de São Paulo.....	150
4.4 Caracterização dos profagos.....	153
5 DISCUSSÃO.....	158
6 CONCLUSÕES.....	165
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	166
APÊNDICES.....	173

CAPÍTULO 1

A IMPORTÂNCIA E OS DESAFIOS DA CITRICULTURA BRASILEIRA

1 INTRODUÇÃO À CITRICULTURA BRASILEIRA

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), o Brasil é o segundo maior produtor de cítricos no mundo, ficando atrás apenas da China (FAO, 2022). No entanto, quando se trata de laranjas-doces, a citricultura brasileira se destaca como líder do setor, sendo responsável por uma produção anual de 16,8 milhões de toneladas da fruta (aproximadamente 40% da produção global), e por 75% das exportações mundiais de suco de laranja (CITRUS INDUSTRY, 2023; USDA/FAS, 2023).

A produção de laranjas-doces concentra-se principalmente no cinturão citrícola, abrangendo áreas no Estado de São Paulo e no Sudoeste do Triângulo Mineiro, totalizando 399,4 mil hectares de pomares e 200 milhões de árvores (FUNDECITRUS, 2023a). Esta cadeia produtiva gera receitas superiores a 1 bilhão de dólares e emprega mais de 200 mil pessoas direta e indiretamente (NEVES; TROMBIN, 2017).

O desenvolvimento do cinturão citrícola foi impulsionado por uma combinação de fatores, como o crescimento industrial, a proximidade estratégica com portos e também com centros de pesquisa. No entanto, a concentração dos pomares citrícolas resultou no aumento expressivo na incidência de pragas e doenças, ocasionando impactos econômicos e sociais significativos. Este desafiador cenário foi, por outro lado, um estímulo para o avanço da pesquisa científica e o desenvolvimento de inovações tecnológicas no setor.

2 HUANGLONGBING (HLB)

O Huanglongbing (HLB), também chamado de greening, é a doença mais destrutiva dos citros (BOVÉ, 2006). Apesar de ter sido primeiramente reportada na China em 1919, o primeiro relato da doença nas américas foi feito somente em 2004 no Brasil, no estado de São Paulo (COLETTA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al.,

2005), e em 2005 nos Estados Unidos, no estado da Flórida (GOTTWALD et al., 2007).

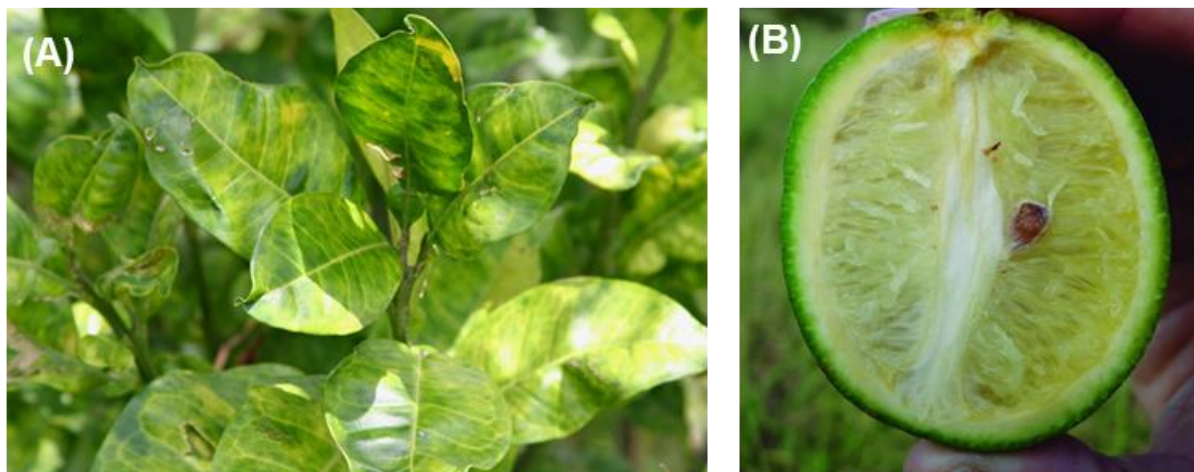
O HLB está associado a bactérias Gram-negativas, fastidiosas e limitadas ao floema, denominadas '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (CLas), '*Ca. L. americanus*' (CLam) e '*Ca. L. africanus*' (CLaf) (BOVÉ, 2006). No Brasil foi relatada a ocorrência de CLas e CLam (TEIXEIRA et al., 2005) e adicionalmente, sintomas de HLB foram associados à fitoplasmas dos grupos 16SrIX e 16SrIII (TEIXEIRA et al., 2008; WULFF et al., 2019).

Após a transmissão da *Liberibacter* pelo inseto vetor psílídeo, os primeiros sintomas da doença podem surgir em um período que varia de 4 meses a um ano (BASSANEZI et al., 2020). Mesmo quando uma planta está infectada, mas não apresenta sintomas visíveis, ela pode servir como fonte de inóculo para outras plantas (LEE et al., 2005). Os primeiros indícios do HLB são caracterizados pelo amarelecimento dos ramos e nas folhas desses ramos, ocorre o sintoma mais distintivo da doença, conhecido como "mosqueado" ou clorose assimétrica (Figura 1A). Esse sintoma característico desempenha um papel fundamental na inspeção de plantas doentes no campo por meio da observação visual e também no diagnóstico laboratorial (BOVÉ, 2006; BELASQUE et al., 2009). Em plantas infectadas é comum observar também sintomas de deficiência nutricional, e em estágios mais avançados da infecção, ocorre a seca e morte dos ponteiros (BOVÉ, 2006). Geralmente, os frutos encontrados nos ramos com sintomas são assimétricos, possuem tamanho reduzido e mostram escurecimento na columela, além de sementes abortadas e deterioração das características organolépticas, como sabor, aroma e textura (Figura 1B). Ocorre também a queda prematura dos frutos, resultando em redução na produção. A queda de produção num pomar está diretamente relacionada à gravidade dos sintomas e à incidência de plantas infectadas (BELASQUE-JUNIOR, 2009; BASSANEZI et al., 2011; BASSANEZI et al., 2020).

A inexistência de variedades comerciais com resistência ao HLB é uma das maiores limitações no manejo. Para minimizar o progresso da disseminação da doença, são preconizadas medidas que visam prevenir a infecção e diminuir as fontes de inóculo, como i) plantio de mudas sadias, ii) inspeções frequentes de plantas sintomáticas nos pomares e sua erradicação e iii) monitoramento e controle da população do psílídeo, majoritariamente com inseticidas (BOVÉ, 2006; SULZBACH et

al., 2017; BASSANEZI et al., 2020). Apesar de todo esforço, em detrimento da dificuldade de manejo, essa doença segue apresentando índices crescentes.

Figura 1. Sintomas típicos do Huanglongbing.



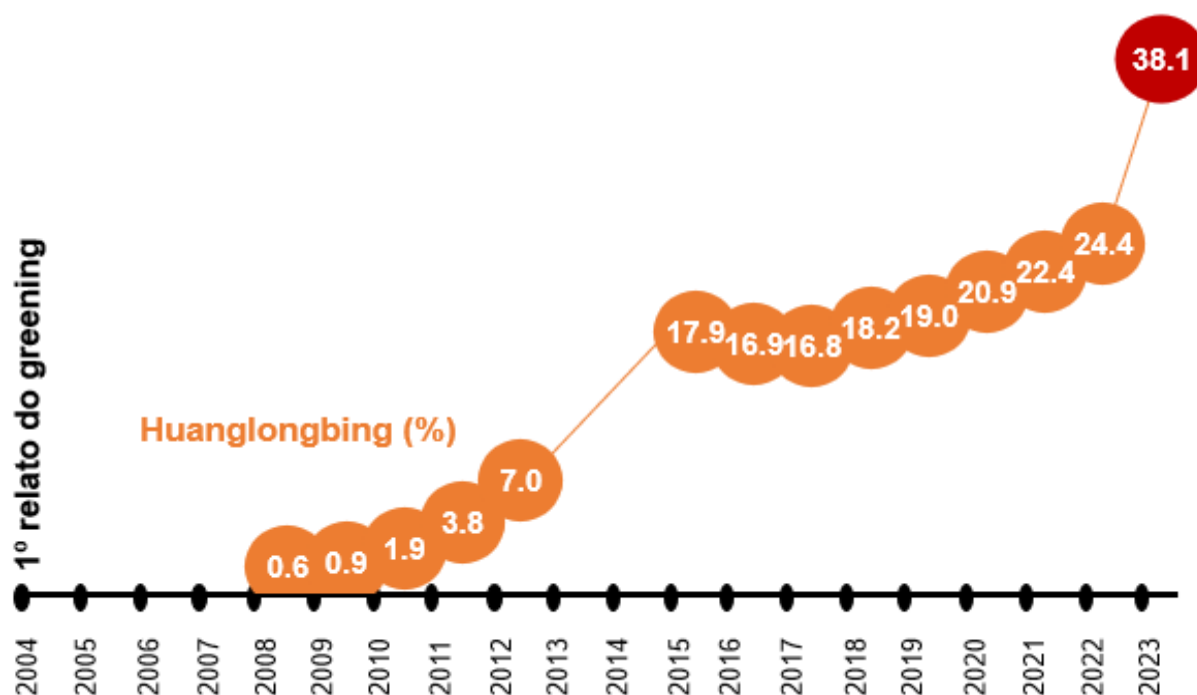
A imagem (A) retrata o sintoma característico do HLB, conhecido como "Mosqueado" ou clorose assimétrica. Já na figura (B), temos a representação de um fruto assimétrico, com sementes abortadas e características organolépticas indesejáveis, originado de uma árvore afetada pelo HLB.

Fonte: Fundecitrus; Citrus Industry

O primeiro levantamento oficial da incidência da doença no cinturão citrícola foi realizado no ano de 2008 e mostrou que 0,61% das árvores estavam infectadas (Figura 2). Em 2015 ocorreu um notável aumento, elevando-se para 17,8% (FUNDECITRUS, 2021). Entre 2015 e 2020 houve uma estabilização na curva de crescimento devido ao estreitamento das medidas de controle (BASSANEZI et al., 2020). Contudo, informações provenientes das estimativas conduzidas em 2022 e 2023 revelam que a incidência média de laranjeiras com sintomas de HLB no cinturão citrícola atingiu 24,42% e 38,10%, respectivamente. Esse aumento representa um crescimento de 56% e pode ser atribuído a fatores como a pandemia do COVID-19 e a resistência dos insetos psílídeos a inseticidas (FUNDECITRUS, 2023b).

A rápida propagação dessa doença, somada aos danos devastadores que ela causa, coloca a indústria citrícola em sério risco.

Figura 2. Percentual (%) de laranjeiras-doces com incidência de sintomas de HLB



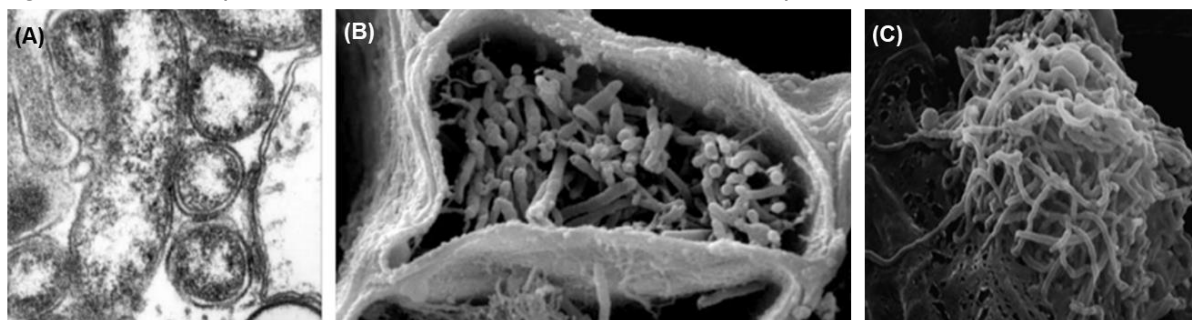
Fonte: Fundecitrus, 2023.

3 EPIDEMIOLOGIA DO HLB

3.1 Liberibactérias

As liberibactérias, responsáveis pelo HLB em citros, são α -Proteobactérias gram-negativas pertencentes à família *Rhizobiaceae* (JAGOEX et al., 1994; MACHADO et al., 2010). Caracterizadas como bactérias intracelulares restritas ao floema, vivem em íntima associação com seus hospedeiros eucarióticos e desenvolveram a capacidade de sobreviver e proliferar dentro de insetos artrópodes como os psílídeos *Diaphorina citri* e *Trioza erytreae* (MCCLEAN, OBERHOLZER, 1965; REYNAUD et al., 2022; YAMAMOTO et al., 2006). Devido à sua restrição aos vasos crivados do floema, também conhecidos como vasos liberianos, e à sua inaptidão para cultivo axênico, foram denominadas como *Candidatus Liberibacter* (JAGOEIX et al., 1994). Estas bactérias têm um genoma reduzido, com um tamanho médio de aproximadamente 1,2 Mbp, uma característica típica de patógenos intracelulares obrigatórios, e são de formato alongado a pleiomórfico (Figura 3).

Figura 3. Microscopia de ‘*Candidatus Liberibacter*’ em células hospedeiras



A imagem (A) refere-se a microscopia eletrônica de transmissão de células do floema de laranja-doce infectada por CLAs, enquanto que a imagem (B) refere-se a microscopia eletrônica de varredura de células de floema de vinca infectadas por CLam. A imagem (C) se refere a microscopia eletrônica de varredura de células do trato intestinal do psílideo *D. citri* infectadas por CLAs.

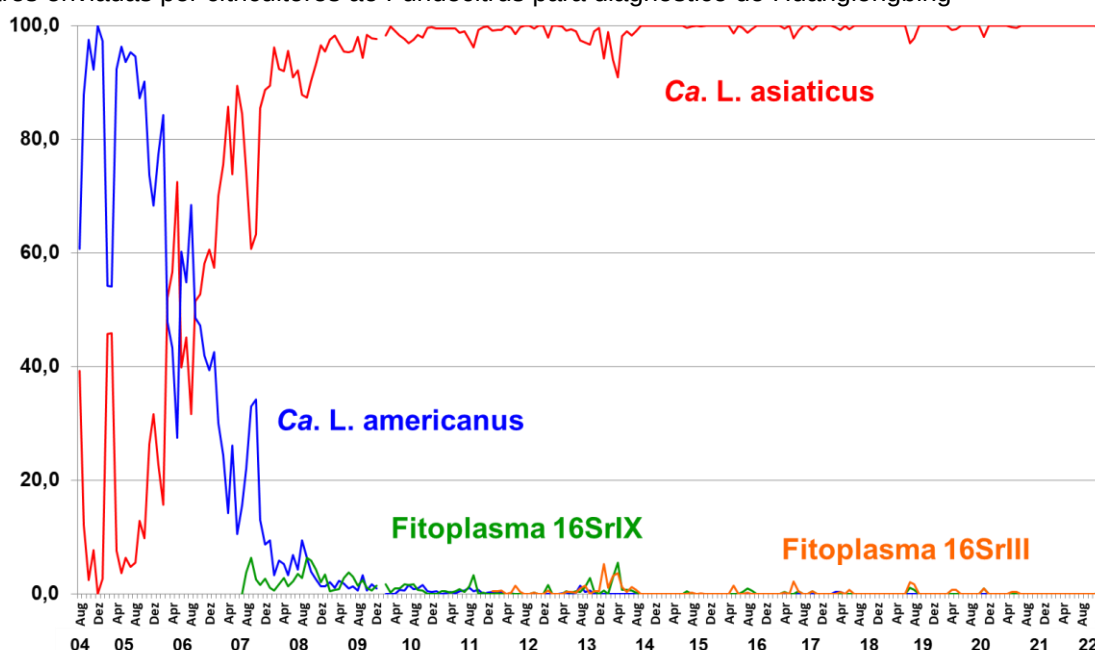
Fonte: E.W. Kitajima (A), F. Tanaka (B) e M. Davis (C).

Há o registro de nove espécies de Liberibactérias conhecidas: CLas, CLam, CLaf, *Ca. L. europaeus* (CLEu), *Ca. L. solanacearum* (CLso), *Ca. Liberibacter brunswickensis* (CLbr), *Ca. Liberibacter capsica* (CLca), *Ca. Liberibacter ctenarytaina* (CLct) e *Liberibacter crescens* (Lcr). Dentre elas, a Lcr é a única capaz de ser cultivada em condições axênicas (JAGOUÉIX et al., 1994; TEIXEIRA et al., 2005; GARNIER et al., 2000a; THOMPSON et al., 2013; LIEFTING et al., 2009; FAGEN et al., 2014). Das espécies mencionadas, CLas, CLam e CLaf estão associadas ao HLB, CLso e CLca são responsáveis por doenças em solanáceas e CLEu, apesar de manter uma relação endofítica com pereiras, foi associada a uma doença em tojo (LIEFTING et al., 2009; RADDADI et al., 2011; THOMPSON et al., 2013). Por outro lado, CLbr e CLct foram isoladas a partir de insetos vetores psílideos, respectivamente *Acizzia sanicola* e *Ctenarytaina fuchsiae*, não sendo associadas até o momento a doenças em plantas (MORRIS et al., 2017; SMITH et al., 2018). Com relação a Lcr, embora tenha sido isolada de babaco papaya, não possui associação com o desenvolvimento de doenças em plantas e seu inseto vetor é desconhecido (LEONARD et al., 2012; THAPA et al., 2020). Devido à inacessibilidade desses patógenos em meio de cultura, o postulado de Koch não foi completamente realizado. No entanto, existem numerosas evidências que sugerem que as Liberibactérias são agentes causadores do HLB e de outras enfermidades em plantas (BOVÉ, 2006; GARNIER et al., 2000b; JAGOUÉIX et al., 1994; TEIXEIRA et al., 2005; HANSEN et al., 2008; LIEFTING et al., 2008, RADDADI et al., 2011; LEONARD et al., 2012).

Quando CLas e CLam foram relatadas no Brasil (TEIXEIRA et al., 2005; COLETTA-FILHO et al., 2004), CLam era a espécie predominante, estando presente

em mais de 77,2% das amostras enviadas por produtores e processadas pelo laboratório de diagnóstico do Fundecitrus, enquanto que CLas estava presente em apenas 21,4% das amostras analisadas (WULFF et al., 2006). Entre 2006 e 2007 ocorreu inversão na predominância destas bactérias (Figura 4). No ano de 2009, a presença de CLam foi observada em apenas 4% das amostras enquanto que houve um aumento significativo de amostras positivas para CLas (TEIXEIRA et al., 2010). Esta mudança observada ao longo do tempo indica a predominância de CLas nas amostras analisadas, em detrimento da redução da frequência de CLam. Desde 2014, a presença de CLam nas amostras de produtores tem sido menor do que 0,1%, indicando o desaparecimento ou quase extinção dessa espécie nos pomares brasileiros (BASSANEZI et al., 2020).

Figura 4. Proporção das espécies de '*Candidatus Liberibacter*' e fitoplasmas presentes em amostras foliares enviadas por citricultores ao Fundecitrus para diagnóstico do Huanglongbing



Foram analisadas mais de 111 mil amostras entre os anos de 2004 e 2022.

Fonte: Nelson A. Wulff, Fundecitrus

A incapacidade de crescimento em meio de cultura em condições axênicas representa uma limitação significativa nos estudos das liberibactérias fitopatogênicas, particularmente nos estudos de genética. Isso restringe a análise dessas bactérias ao âmbito da detecção, genômica e caracterização populacional por marcadores moleculares (JAGOUÉIX et al., 1994; MATOS et al., 2013; DENG et al., 2014; MA et al., 2014; GHOSH et al., 2015). Diante desse desafio, a expressão heteróloga emerge

como uma alternativa viável para a caracterização de genes presentes em liberibactérias fitopatogênicas (VAHLING et al., 2010). Liberibactérias como Lcr, cujo genoma foi completamente sequenciado (LEONARD et al., 2012; FAGEN et al., 2014), tornam-se ferramentas em estudos funcionais. Isso se deve ao fato de serem usadas como organismos modelo devido à proximidade filogenética que possuem com as bactérias fitopatogênicas. Estudos realizados por NARANJO et al. (2019) utilizando Lcr permitiram a caracterização da formação de biofilme em liberibactérias, evidenciando a adesão superficial e a formação de agregados celulares. LAI et al. (2016) identificaram genes potencialmente relacionados à culturabilidade de Lcr, enquanto FLEITES et al. (2014) e JAIN et al. (2015) utilizaram essa espécie para caracterizar genes associados aos profagos de CLas, os quais exibiram atividades como peroxidase, holina e lisozima. Ainda, nestes estudos a utilização do sistema de expressão heteróloga em *E. coli* se tornou essencial para a produção destas proteínas (FLEITES et al., 2014).

3.1.2 Profagos em Liberibactérias

Os bacteriófagos, também conhecidos como fagos, são vírus que infectam quase todas as espécies de bactérias, desempenhando um papel fundamental na regulação das populações bacterianas e na evolução desses microrganismos (VARANI et al., 2013; WOMMACK; COLWELL, 2000; KIDAMBI; RIPP; MILLER, 1994). Profagos são formas latentes de bacteriófagos, que se integram ao genoma de uma bactéria hospedeira. Ao contrário dos bacteriófagos líticos, que destroem as células hospedeiras durante o ciclo de replicação, os profagos permanecem inativos, integrados ao genoma da bactéria hospedeira, podendo conferir propriedades fenotípicas como patogenicidade, além de outras vantagens adaptativas (BRUSSOW; CANCHAYA; HARDT, 2004; CASJENS et al. 2003; ZHANG et al., 2011; VARANI et al., 2013).

Quando o primeiro genoma de CLas foi obtido com estratégia de metagenômica em 2009, informações intrínsecas sobre a bactéria foram reveladas, como a ausência de sistemas de secreção do tipo III e tipo IV completos, alta porcentagem de genes envolvidos em motilidade celular e transporte ativo, e presença da região de profagos (DUAN et al., 2009; ZHANG et al., 2011). O genoma parcial da estirpe UF506 revelou a presença de dois profagos, classificados como tipo 1 (SC1) e tipo 2 (SC2) (DUAN et

al., 2009; ZHANG et al., 2011; ZHENG et al., 2018; ZHOU et al., 2011). Tais profagos mesmo apresentando variações em ocorrência e forma, estão presentes em outras estirpes de Liberibactérias (ZHANG et al., 2011, KATOH et al., 2014, ZHENG et al., 2015, DA SILVA et al., 2019, LIU et al., 2020; CUI et al., 2021). Recentemente, diferentes tipos de profagos foram identificados e caracterizados, incluindo o tipo 3, o tipo 4 (fragmentado) e dois tipos específicos encontrados apenas em estirpes do Paquistão (CUI et al., 2021; ZHENG et al., 2018). Além do isolado da China JXGC, o profago do tipo 3 foi detectado também no isolado dos Estados Unidos AHCA1 e no isolado do Brasil 9PA (DAROLT et al., 2021; SILVA et al., 2021). Profagos com estrutura e sintenia similares a SC1 e SC2 também foram observados no genoma de CLam (WULFF et al., 2014) e de CLso (LIN et al., 2013). No genoma de Lcr, foram identificados dois possíveis profagos, LC1 e LC2, que não apresentam homologia com SC1 e SC2 (LEONARD et al., 2012). Embora haja poucas informações sobre o papel biológico e as interações dos profagos, é sabido que eles estão diretamente relacionados à diversidade genética entre os isolados de liberibactérias, sendo associados a rearranjos e variabilidade (TOMIMURA et al., 2009; VARANI et al., 2008; ZHOU et al., 2011; ZHENG et al., 2016). Acredita-se também que esses profagos possam influenciar a capacidade de cultivo de CLas ao potencialmente desencadear o ciclo lítico na ausência de fatores produzidos pelos hospedeiros da bactéria (FLEITES et al., 2014).

Os três tipos de profagos de CLas mais bem caracterizados, 1, 2 e 3, são estruturalmente divididos em duas regiões principais, sendo a região dos genes tardios e a região dos genes precoces. A região dos genes precoces é bem conservada e possui genes envolvidos na replicação do DNA (ZHENG et al., 2011). Por outro lado, a região dos genes tardios representa a maior fonte de variabilidade entre os profagos, contendo genes relacionados ao ciclo lítico e outros, como genes estruturais, lisozimas, endolisinas, colicinas, integrases, terminases e peroxidases (ZHENG et al., 2011). Além disso, os profagos de CLas podem apresentar-se tanto na forma integrada *in tandem* quanto na forma circular no genoma, e a região de integração ocorre no gene da DNA/RNA helicase presente na região dos genes precoces, cuja sequência apresenta homologia com a DNA/RNA helicase do genoma de CLas (ZHENG et al., 2011; ZHENG et al., 2018).

No contexto da presença de bacteriocinas, como a colicina, e lisozimas nos profagos de CLas, essas substâncias podem influenciar a dinâmica de competição

entre as bactérias responsáveis pelo HLB. Essa observação é sustentada por analogias em outros sistemas, como as competições entre diferentes estirpes de *Enterococcus faecalis*, que produzem ou não bacteriocinas, no trato digestivo de mamíferos (KOMMINENI et al., 2015).

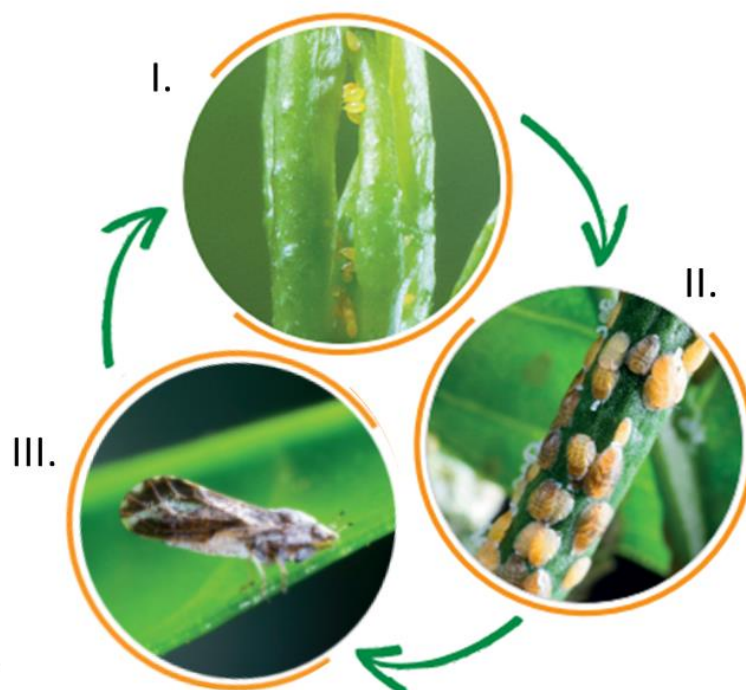
Os profagos de CLas se apresentam como as maiores fontes de variabilidade nos genomas destas bactérias, refletindo em diversidade genética, potencial de patogenicidade, rearranjos, ciclo lítico, competitividade e sobrevivência, e desempenhando um papel crucial na evolução e adaptação desse patógeno.

3.2 Psílídeo *Diaphorina citri*

As liberibactérias patogênicas encontradas no Brasil são disseminadas pelo psílídeo asiático dos citros, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) (COLETTA-FILHO et al., 2004; YAMAMOTO et al., 2006; CANALE et al., 2017). Esse inseto desempenha um papel fundamental na propagação da doença no campo e os psílídeos tem uma história evolutiva estreitamente relacionada com as liberibactérias (Nelson et al., 2013).

Descoberto na década de 1940, o psílídeo *D. citri* era considerado uma praga secundária até o primeiro relato de HLB em cítricos no Brasil em 2004 (COLETTA-FILHO et al., 2004). Ao longo de seu desenvolvimento, o *D. citri* atravessa estágios que vão desde o ovo (I) passando pela ninfa (II) e culminando em sua fase adulta (III), conforme ilustrado na Figura 5, com um período médio de cerca de 19 dias até alcançar a maturidade (BRAGARD et al. em 2021). Ao alimentar-se no floema de plantas infectadas, o *D. citri* adquire a bactéria, permitindo sua colonização e multiplicação em órgãos como a glândula salivar, o canal alimentar e o intestino (AMMAR et al., 2014). Ao repetir o processo de alimentação, transmite então a bactéria. Tanto a aquisição quanto a transmissão ocorrem em um curto período de apenas 15 minutos, e a taxa de transmissão ou aquisição da bactéria está diretamente relacionada ao tempo de alimentação do inseto. Ainda, psílídeos que passam por seu desenvolvimento desde a fase de ovo até a fase adulta em plantas doentes demonstram uma maior eficiência na transmissão comparados àqueles que adquirem a bactéria apenas na fase adulta (AMMAR et al., 2016).

Figura 5. Estágios do psílídeo *Diaphorina citri*, de ninfa até adulto.



Em I. está indicado a fase de ovos de *Diaphorina citri*, enquanto que em II. e III. tem-se respectivamente fase de ninfas e adulto

Fonte: Fundecitrus

A relação do *D. citri* com a bactéria é circulativa e propagativa, significando que a partir do momento em que ocorre a infecção, e após o período de incubação e latência (CANALE et al., 2017), o psílídeo irá disseminar a doença até o final de sua vida. Por esse motivo, o psílídeo *D. citri* é considerado uma das principais pragas da citricultura estando presente nos pomares durante todo o ano.

4 PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS PARA MANEJO DO HLB

Desde o seu surgimento em 2004, o manejo do HLB no Brasil baseia-se em recomendações destinadas a prevenir a disseminação da doença (ALQUEZÁR et al., 2022; BASSANEZI et al., 2020). Essas recomendações concentram-se principalmente no sistema de manejo tripé do HLB. No entanto, outras diretrizes, como planejamento e renovação do pomar, estímulo ao crescimento e antecipação da produtividade das plantas, inspeções regulares de todas as plantas do pomar, monitoramento do psílídeo, cuidados especiais com as bordas do pomar, participação em estratégias de manejo regional e cooperação com os vizinhos, contribuem para que a incidência da

doença se mantenha estável e não ameace a produtividade dos pomares (AYRES et al., 2019).

Aliada as estratégias de manejo, a biotecnologia surge como uma ferramenta para a criação e aplicação de soluções inovadoras. Entre os avanços relacionados às estratégias para o controle do HLB, observou-se resistência genética de algumas espécies correlacionadas a citros e compatíveis via enxertia (RAIOL-JÚNIOR et al., 2022), como *Microcitrus* spp., *Eremocitrus glauca* e seus híbridos (ALVES et al., 2021), trazendo possibilidade de associar o melhoramento clássico às novas abordagens de genômica. No entanto, devido à inexistência de variedades comerciais resistentes (FOLIMONOVA et al., 2009) e à desafios do melhoramento clássico, a engenharia genética surge como uma importante alternativa ao manejo do HLB (PEÑA et al., 2008). Diversas estratégias empregando a engenharia genética têm sido utilizadas na resistência de plantas a doenças bacterianas, como por exemplos a produção de peptídeos e proteínas antimicrobianas, inibição da patogenicidade ou dos fatores de virulência pela interrupção do processo de percepção de *quorum-sensing*, o aumento das defesas naturais e morte celular programada no local da infecção (HARMON, 2013; HUANG et al., 2021, SCHULER et al., 1998; WANG, 2021, XU et al., 2023). Porém, estas estratégias não foram até o momento eficazes em gerar plantas com resistência ao HLB (FELIPE et al., 2013; DUTT et al., 2015, HUANG et al., 2021; XU et al., 2023). Nesse sentido cada vez mais esforços são direcionados para superar essas limitações e desenvolver abordagens mais eficazes no contexto da resistência de plantas ao Huanglongbing (HLB).

5 DESAFIOS FUTUROS E PERSPECTIVAS

Os desafios futuros e as perspectivas para o HLB representam uma área crítica de preocupação na agricultura, dada a contínua ameaça que essa doença impõe aos pomares de citros em todo o mundo (ALQUEZÁR, et al., 2022; PONTES et al., 2023). Enquanto esforços significativos têm sido empregados para entender, controlar e mitigar os efeitos do HLB, muitos desafios persistem, e novas abordagens são necessárias para garantir a sustentabilidade e a produtividade dos pomares (ALQUEZÁR et al., 2021; PONTES et al., 2023). A resistência genética tem sido um foco importante, mas há um longo prazo necessário para a produção de variedades com resistência efetiva ou duradoura ao HLB (ALVES et al., 2021; FOLIMONOVA et

al., 2009; XU et al., 2023). A engenharia genética e a biotecnologia continuam a oferecer promessas, mas há a necessidade de superar obstáculos técnicos e questões regulatórias. Além disso, a compreensão aprofundada da interação entre a bactéria causadora do HLB, o vetor de transmissão (psílídeo) e as plantas hospedeiras é crucial e pode revelar alvos específicos para intervenções mais eficazes (DAROLT et al., 2021). Nesse sentido, a busca por um entendimento mais abrangente do genoma de CLas explorando sua diversidade genética e identificando genes associados à resistência, como bacteriocinas e lisozimas, visa antecipar a elaboração de estratégias eficazes para o seu combate.

A gestão integrada, combinando práticas agrícolas sustentáveis, controle de insetos vetores com uso de plantas repelentes e o uso de tecnologias inovadoras, surge como uma estratégia para reduzir a disseminação do HLB (AYRES et al., 2023, SANTOS, 2019). A coordenação entre pesquisadores, agricultores, instituições governamentais e a indústria é essencial para desenvolver e implementar estratégias holísticas e sustentáveis. Perspectivas futuras incluem além do desenvolvimento de plantas resistentes, e estreitamento das estratégias de manejo, o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico mais rápidas e precisas, permitindo uma detecção precoce e resposta rápida à presença do HLB (MARTINS, 2023; PONTES et al., 2023; GHOSH et al., 2023).

Em última análise, a superação dos desafios futuros do HLB exige uma abordagem colaborativa e inovadora, integrando conhecimento científico, práticas agrícolas avançadas e tecnologias emergentes para garantir um futuro mais robusto para a indústria citrícola global.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALQUÉZAR, B.; CARMONA, L.; BENNICI, S.; PEÑA, L. Engineering citrus to obtain huanglongbing resistance. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 7, p. 196-203, 2021
- ALQUÉZAR, B.; CARMONA, L.; BENNICI, S.; MIRANDA, M. P.; BASSANEZI, R. B.; PEÑA, L. Cultural Management of Huanglongbing: Current Status and Ongoing Research. *Phytopathology*, v. 112, n. 1, p. 11-25, 2022.
- AMMAR, E. D.; RAMOS, J. E.; HALL, D. G.; DAWSON, W. O.; SHATTERS Jr., R. G. Acquisition, Replication and Inoculation of *Candidatus Liberibacter asiaticus* following Various Acquisition Periods on Huanglongbing Infected Citrus by Nymphs and Adults of the Asian Citrus Psyllid. *PLoS ONE*, v. 11, n. 7, 2016.
- ALVES, M. N.; LOPES, S. A.; RAIOL-JUNIOR, L. L.; WULFF, N. A.; GIRARDI, E. A.; OLLITRAULT, P.; PEÑA, L. Resistance to *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the Huanglongbing Associated Bacterium, in Sexually and/or Graft-Compatible Citrus Relatives. *Frontiers in Plant Science*, v. 11, p. 617-664, 2021.
- AMMAR, E. D.; RICHARDSON, M. L.; ABDO, Z.; HALL, D. G.; SHATTERS-Jr, R. G. Differences in stylet sheath occurrence and the fibrous ring (*sclerenchyma*) between Citroncirus plants relatively resistant or susceptible to adults of the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *PLoS ONE*, v. 9, n. 10, 2014.
- AYRES, A., J. et al. Manejo do greening: 10 mandamentos para o sucesso no controle da doença. Araraquara: Fundecitrus, 2019.
- BARBIERI, H. B.; FERNANDES, L. S.; PONTES, J. G. M.; PEREIRA, A. K.; FILL, T. P. An overview of the most threatening diseases that affect worldwide citriculture: Main features, diagnose, and current control strategies. *Frontiers in Natural Products*, v. 2, p. 104-5364, 2023. DOI: 10.3389/fntpr.2023.
- BASSANEZI, R. B.; LOPES, S. A.; DE MIRANDA, M. P.; WULFF, N. A.; VOLPE, H. X. L.; AYRES, A. J. Overview of citrus huanglongbing spread and management strategies in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, v. 45, n. 3, p. 251–264, 2020.
- BASSANEZI, R. B.; MONTESINO, L. H.; GASPAROTO, M. C. G.; BERGAMIN-FILHO, A.; AMORIM, L. Yield loss caused by huanglongbing in different sweet orange cultivars in São Paulo, Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, v. 130, p. 577-586, 2011.
- BELASQUE-JUNIOR, J.; BERGAMIM-FILHO, A.; BASSANEZI, R. B.; BARBOSA, J. C. FERNANDES, N. G.; YAMAMOTO, P. T.; LOPES, S. A.; MACHADO, M. A.; JUNIOR, R. P. L.; AYRES, A. J.; MASSARI, C. A. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. *Tropical Plant Pathology*, v. 34, n. 3, p. 137-145, 2009.

- BRUSSOW, H.; CANCHAYA, C.; HARDT, W. D. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 68, n. 3, p. 560–602, 2004.
- CANALE, M. C.; TOMASETO, A. T.; HADDAD, M. L.; COLETTA-FILHO, H. D.; LOPES, J. R. S. Latency and Persistence of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Its Psyllid Vector, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Phytopathology*, v. 10, p. 264-272, 2017.
- CASJENS, Sherwood. Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Molecular Microbiology*, v. 49, n. 2, p. 277-300, jul. 2003.
- CITRUS INDUSTRY. Leading Citrus Producers of the World. 14 de fevereiro de 2023. Disponível em: <https://citrusindustry.net/2023/02/14/leading-citrus-producers-of-the-world/>. Acesso em: 03 de dezembro de 2023.
- COLETTA-FILHO, H. D.; TARGON, M. L. P. N.; TAKITA, M. A.; DE NEGRI, J. D.; POMPEU, J. J.; MACHADO, M. A. First report of the causal agent of huanglongbing (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) in Brazil. *Plant Disease*, v. 88, p. 1382, 2004.
- CUI, X.; LIU, K.; ATTA, S.; ZENG, C.; ZHOU, C.; WANG, X. Two Unique Prophages of *Candidatus Liberibacter asiaticus* Strains from Pakistan. *Phytopathology*, v. 111, n. 5, p. 784-788, 2021.
- DA SILVA, P. A.; FASSINI, C. G.; SAMPAIO, L. S.; DEQUIGIOVANNI, G.; ZUCCHI, M. I.; WULFF, N. A. Genetic Diversity of *Candidatus Liberibacter asiaticus* Revealed by Short Tandem Repeats and Prophage Typing Indicates Population Homogeneity in Brazil. *Phytopathology*, v. 109, p. 960-971, 2019.
- DAROLT, J. C.; BENTO, F. M. M.; MERLIN, B. L.; PEÑA, L.; CÔNSOLI, F. L.; WULFF, N. A. The Genome of *Candidatus Liberibacter asiaticus* Is Highly Transcribed When Infecting the Gut of *Diaphorina citri*. *Front. Microbiol.*, v. 12, Jul. 2021, Sec. Microbe and Virus Interactions with Plants.
- DENG, X.; LOPES, S.; WANG, X.; SUN, X.; JONES, D.; IREY, M.; CIVEROLO, E.; CHEN, J. Characterization of *Candidatus Liberibacter asiaticus* populations by double-locus analyses. *Current Microbiology*, v. 69, p. 554-560, 2014.
- DUAN, Y.; ZHOU, L.; HALL, D. G.; LI, W.; DODDAPANENI, H.; LIN, H.; LIU, L.; VAHLING, C. M.; GABRIEL, D. G.; WILLIAMS, K. P.; DICKERMAN, A.; SUN, Y.; GOTTWALD, T. Complete genome sequence of citrus huanglongbing bacterium, *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Molecular Plant-microbe Interactions*, v. 22, n. 8, p. 1011-1020, 2009.
- DUTT, M.; BARTHE, G.; IREY, M.; GROSSER, J. Transgenic citrus expressing an Arabidopsis RPR1 gene exhibit enhanced resistance against Huanglongbing (HLB; Citrus Greening). *PLOS ONE*, v. 10, n. 9, 2015.

- FAGEN, J. R.; LEONARD, M. T.; COYLE, J. F.; MCCULLOUGH, C. M.; DAVIS-RICHARDSON, A. G.; DAVIS, M. J.; TRIPLETT, E. W. *Liberibacter crescens* gen. nov., sp. nov., the first cultured member of the genus *Liberibacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 64, p. 2461–2466, 2014.
- FELIPE, R. T. A.; MOURÃO-FILHO, F. A. A.; LOPES, S. A.; MENDES, B. M. J.; BEHLING, M.; PEREIRA-JR, E. V. Reaction of sweet orange cultivars expressing the attacin A gene to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 48, n. 11, p. 1440-1448, 2013.
- FOLIMONOVA, S. Y.; ROBERTSON, C. J.; GAMSEY, S. M.; DAWSON, W. O. Examination of the responses of different genotypes of citrus to huanglongbing (citrus greening) under different conditions. *Phytopathology*, v. 23, p. 1346–1354, 2009.
- FUNDECITRUS. Levantamento de greening 2021: conheça a situação da doença a partir das análises do Fundecitrus. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/levantamento-de-greening-2021-conheca-a-situacao-da-doenca-a-partir-das-analises-do-fundecitrus/1093#:~:text=O%20levantamento%20de%20greening%202021,pomar%20e%20n%C3%ADvel%20de%20severidade>. Acesso em: 10 out. 2021.
- FUNDECITRUS. Inventário de árvores e estimativa da safra de laranja do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste mineiro. 2023a Disponível em: https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/2023_06_05_Inventario_e_Estimativa_do_Cinturao_Citricola_2023-2024.pdf. Acesso em: 01 de novembro de 2023.
- FUNDECITRUS. População de psíldeo em SP e MG é a maior da série histórica. 14 jul. 2023b. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/populacao-de-psildeo-em-sp-e-mg-e-a-maior-da-serie-historica/1339>. Acesso em: 18 de jan. 2024
- GARNIER, M.; JAGOUÉIX-EVEILLARD, S.; CRONJE, P. R.; LE ROUX, H. F.; BOVÉ, J. M. Genomic characterization of a liberibacter present in an ornamental rutaceous tree, *Calodendrum capense*, in the Western Cape Province of South Africa. Proposal of '*Candidatus Liberibacter africanus* subsp. *capensis*'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 50, p. 2119–2125, 2000a.
- GARNIER, M.; BOVÉ, J. M.; CRONJE, C. P. R.; SANDERS, G. M.; KORSTEN, L.; LEROUX, H. F. Presence of "*Candidatus Liberibacter africanus*" in the Western Cape province of South Africa. *Proc. Conf. Int. Organ. Citrus Virol.*, 14th, Campinas, São Paulo, Sept. 13 –18, 1998, p. 369–72. Riverside, CA: IOCV, 2000b.
- GHOSH, D. K.; BHOSE, S. P.; MOTGHARE, M. R.; WARGHANE, A. J.; MUKHERJEE, K. Genetic Diversity of the Indian Populations of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'

based on the tandem repeat variability in a Genomic Locus. *Phytopathology*, v. 105, p. 1043–1049, 2015.

GHOSH, D.; KOKANE, S.; SAVITA, B. K.; KUMAR, P.; SHARMA, A. K.; OZCAN, A.; KOKANE, A.; SANTRA, S. Huanglongbing Pandemic: Current Challenges and Emerging Management Strategies. *Plants (Basel)*, 12(1), 160, 2022. DOI: 10.3390/PLANTS12010160. PMID: 36616289; PMCID: PMC9824665.

GOTTWALD, T. R.; DA GRAÇA, J. V.; BASSANEZI, R. B. Citrus Huanglongbing: the pathogen and its impact. *Plant Health Progress*, v. 8, n. 1, 2007.

FLEITES, L.; JAIN, M.; ZHANG, S.; GABRIEL, D. W. "*Candidatus* Liberibacter asiaticus" prophage late genes may limit host range and culturability. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 80, n. 19, p. 6023-6030, 2014.

HANSEN, A. K.; TRUMBLE, J. T.; STOUTHAMER, R.; PAINE, T. D. A new Huanglongbing species, "*Candidatus* Liberibacter psyllauros," found to infect tomato and potato, is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 18, p. 5862–5865, 2008.

HUANG, C.; ARAUJO, C.; SÁNCHEZ, J. N.; KUND, G.; TRUMBLE, J.; ROPER, C.; GODFREY, K. E.; JIN, H. A stable antimicrobial peptide with dual functions of treating and preventing citrus Huanglongbing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 118, n. 6, 2021.

JAGOEIX, S.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 44, n. 3, p. 379–386, 1994.

JAIN, M.; FLEITES, L. A.; GABRIEL, D. W. Prophage-encoded peroxidase in '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' is a secreted effector that suppresses plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 28, n. 12, p. 1330-1337, 2015.

KATOH, H.; MIYATA, S.; INOUE, H.; IWANAMI, T. Unique features of a Japanese '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' strain revealed by whole-genome sequencing. *Plos One*, v. 9, n. 9, 2014.

KIDAMBI, S. P.; RIPP, S.; MILLER, R. V. Evidence for phage-mediated gene transfer among *Pseudomonas aeruginosa* strains on the phylloplane. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, n. 2, p. 496–500, 1994.

KOMMINENI, S.; BRETEL, D. J.; LAM, V.; CHAKRABORTY, R.; HAYWARD, M.; SIMPSON, P.; CAO, Y.; BOUSOUNIS, P.; KRISTICH, C. J.; SALZMAN, N. Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian gastrointestinal tract. *Nature*, v. 526, n. 7575, p. 719-722, 2015.

LAI, K. K.; DAVIS-RICHARDSON, A. G.; DIAS, R.; TRIPLETT, E. W. Identification of the genes required for the culture of *Liberibacter crescens*, the closest cultured relative of the *Liberibacter* plant pathogens. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 547, 2016.

- LEE, J. A.; HALBERT, S. E.; DAWSON, William O.; SINGER, B. H. Asymptomatic spread of huanglongbing and implications for disease control. *Plant Pathology*, v. 112, n. 24, p. 7605-7610.
- LEONARD, M. T.; FAGEN, J. R.; DAVIS-RICHARDSON, A. G.; DAVIS, M. J.; TRIPLETT, E. W. Complete genome sequence of *Liberibacter crescens* BT-1. *Standards in Genomic Sciences*, v. 7, p. 271-283, 2012.
- LIEFTING, L. W.; WEIR, B. S.; PENNYCOOK, S. R.; CLOVER, G. R. G. '*Candidatus* *Liberibacter solanacearum*', associated with plants in the family Solanaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 59, p. 2274–2276, 2009.
- LIN, H.; COLETTA-FILHO, H. D.; HAN, C. S.; LOU, B.; CIVEROLO, E. L.; MACHADO, M. A.; GUPTAC, G. Draft genome sequence of '*Candidatus* *Liberibacter americanus*' bacterium associated with citrus Huanglongbing in Brazil. *Genome Announcements*, v. 1, n. 3, 2013.
- MA, W.; LIANG, M.; GUAN, L.; XU, M.; WEN, X.; DENG, X. et al. Population Structures of '*Candidatus* *Liberibacter asiaticus*' in Southern China. *Phytopathology*, v. 104, p. 158–162, 2014.
- MACHADO, A. M.; LOCALI-FABRIS, E. C.; COLETTA-FILHO, E. D. *Candidatus* *Liberibacter* spp., agentes do huanglongbing dos citros. *Citrus Research & Technology*, v. 31, n. 1, p. 25-35, 2010.
- MARTINS, Elaine Cristina. Caracterização biológica de um clone infeccioso do Citrus tristeza virus (CTV) de origem brasileira, utilização do vetor viral CTV para o controle de *Candidatus* *Liberibacter asiaticus* e método multiplex de detecção das bactérias associadas ao Huanglongbing. 2023. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, 199 f.
- 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, n. 11, 2013.
- MCCLEAN, A. P. D.; OBERHOLZER, P. C. J. Citrus Psylla, a Vector of the Greening Disease of Sweet Orange. *South African Journal of Agricultural Science*, v. 8, p. 297-298, 1965.
- MORRIS, J.; SHILLER, J.; MANN, R.; SMITH, G.; YEN, A.; RODONI, B. Novel '*Candidatus* *Liberibacter*' species identified in the Australian eggplant psyllid, *Acizzia solanicola*. *Microb Biotechnol*, v. 10, n. 4, p. 833-844, Jul 2017.
- NARANJO, E.; MERFA, M. V.; FERREIRA, V.; JAIN, M.; DAVIS, M. J.; BAHAR, O.; GABRIEL, D.; DE LA FUENTE, D. *Liberibacter crescens* Biofilm Formation in Vitro: Establishment of a Model System for Pathogenic '*Candidatus* *Liberibacter* spp.'. *Scientific Reports*, v. 9, p. 5150, 2019.

- NELSON, W.R.; MUNYANEZA, J.E.; MCCUE, K.F.; BOVÉ, J.M. The Pangaeian Origin of *Candidatus Liberibacter* Species. *Journal of Plant Pathology*, v. 95, p. 455-461, 2013.
- NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G. Anuário da Citricultura 2017. São Paulo: CitrusBR. 57 p., 2017.
- NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. O Retrato da Citricultura Brasileira. São Paulo: CitrusBR. 137 p., 2010.
- PONTES, João Guilherme de Moraes et al. Huanglongbing: O Que Se Sabe até Agora Sobre a Maior Ameaça para a Citricultura Mundial? *Revista Virtual de Química*, v. 15, n. 5, p. 1010-1027, Sociedade Brasileira de Química, 2023.
- RADDADI, N.; GONELLA, E.; CAMEROTA, C.; PIZZINAT, A.; TEDESCHI, R.; CROTTI, E.; MANDRIOLI, M.; BIANCO, P. A.; DAFFONCHIO, D.; ALMA, A. "*Candidatus Liberibacter europaeus*" sp. nov. that is Associated with and Transmitted by the Psyllid *Cacopsylla pyri* Apparently Behaves as an Endophyte Rather than a Pathogen. *Environmental Microbiology*, v. 13, n. 2, p. 414–426, 2011.
- REYNAUD, B.; TURPIN, P.; MOLINARI, F. M.; GRONDIN, M.; ROQUE, S.; CHIROLEU, F.; FERERES, A.; DELATTE, H. The African citrus psyllid *Trioza erythrae*: An efficient vector of *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Frontiers in Plant Science*, v. 13, sec. Plant Pathogen Interactions.
- SANTOS, Mateus de Almeida. Produção e emissão de β -cariofileno em laranjeiras e *Arabidopsis thaliana* pela superexpressão de terpeno sintases e avaliação da expressão gênica nas vias biossintéticas para produção de terpenos. 2019. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, 136 f.
- SCHULER, T. H.; POPPY, G. M.; KERRY, B. R.; DENHOLM, I. Insect-Resistant Transgenic Plants. *Trends in Biotechnology*, v. 16, n. 4, p. 168–175, 1998.
- SMITH, G. R.; THOMPSON, S.; DAVID, C. C. Initial analysis of the draft genome of *Candidatus Liberibacter ctenarytaina*. In: THE 13TH AUSTRALASIAN PLANT VIROLOGY WORKSHOP, 13, The Venue, Waiheke Island, New Zealand, 20-22 February 2018.
- SILVA, P. A.; WULFF, N. A.; ZHENG, Z.; KRUGNER, R.; CHEN, J. Genome Sequence Resource of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' Strain 9PA from Brazil. *Plant Disease*, v. 105, p. 199-201, 2021.
- SULZBACH, M.; OLIVEIRA, R. P.; GIRARDI, E. A.; SCHWARZ, S. F.; BERTOLINI, E.; SCHNEIDER, L. A.; GONZATTO, M. P. Huanglongbing (HLB) dos Citros e Estratégias de Manejo Visando Prevenção e Controle. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2017. 38p.

- THAPA, S. P.; DE FRANCESCO, A.; TRINH, J.; GURUNG, F. B.; PANG, Z.; VIDALAKIS, G.; WANG, N.; ANCONA, V.; MA, W.; COAKER, G. Genome-wide analyses of *Liberibacter* species provide insights into evolution, phylogenetic relationships, and virulence factors. *Molecular Plant Pathology*, v. 21, n. 5, p. 716-731, 2020. DOI: 10.1111/mpp.12925.
- TEIXEIRA, D. C.; SAILLARD, C.; EVEILLARD, S.; DANET, J. L.; COSTA, P. I.; AYRES, A. J.; BOVÉ, J. "*Candidatus* *Liberibacter americanus*", Associated with Citrus Huanglongbing (Greening Disease) in Sao Paulo State, Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 55, p. 1857–1862, 2005.
- TEIXEIRA, D. C.; WULFF, N. A.; LOPES, S. A.; YAMAMOTO, P. T.; MIRANDA, M. P.; SPÓSITO, M. B.; BELASQUE JR., J.; BASSANEZI, R. B. Caracterização e Etiologia das Bactérias Associadas ao Huanglongbing dos Citros. *Citrus Research & Technology*, v. 31, n. 2, p. 115-128, 2010.
- TEIXEIRA, D. C.; WULFF, N. A.; MARTINS, E. C.; KITAJIMA, E. W.; BASSANEZI, R.; AYRES, A. J.; EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J. M. A Phytoplasma Closely Related to the Pigeon Pea Witches'-Broom Phytoplasma (16Sr IX) Is Associated with Citrus Huanglongbing Symptoms in the State of Sao Paulo, Brazil. *Phytopathology*, v. 98, p. 977-984, 2008.
- TOMIMURA, K.; MIYATA, S. I.; FURUYA, N.; KUBOTA, K.; OKUDA, M.; SUBANDIYAH, S.; HUNG, T. H.; SU, H. J.; IWANAMI, T. Evaluation of Genetic Diversity Among '*Candidatus* *Liberibacter asiaticus*' Isolates Collected in Southeast Asia. *Phytopathology*, v. 99, n. 9, p. 1062-1069, 2009.
- THOMPSON, S.; FLETCHER, J. D.; ZIEBELL, H.; BEARD, S.; PANDA, P.; JORGENSEN, N.; FOWLER, S. V.; LIEFTING, L. W.; BERRY, N.; PITMAN, A.R. First report of '*Candidatus* *Liberibacter europaeus*' associated with psyllid infested Scotch broom. *New Disease Reports*, v. 27, n. 6, 2013.
- USDA/FAS - FOREIGN AGRICULTURAL SERVICES. Citrus: World Markets and Trade. July 2023. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>. Acesso em: 09 de novembro de 2023.
- VAHLING, C. M.; DUAN, Y.; LIN, H. Characterization of an ATP Translocase Identified in the Destructive Plant Pathogen *Candidatus* *Liberibacter asiaticus*. *J. Bacteriol.*, v. 192, n. 3, p. 834–840, 2010.
- VARANI, A. M.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; NAKAYA, H. I.; SLUYS, M. A. V. The Role of Prophage in Plant-Pathogenic Bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 51, 429–451, 2013.
- WOMMACK, K. E.; COLWELL, R. R. Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 64, n. 1, p. 69–114, 2000.
- WULFF, N. A.; TEIXEIRA, D. C.; MARTINS, E. C.; PADIAR, N. R. H.; MARIANO, A. G.; CARMO, A. E.; ABRAHÃO, D. P.; SOUSA, M. C.; AYRES, A. J.; BOVÉ, J. M.

Huanglongbing Diagnosis. In: Huanglongbing – Greening International Workshop, 2006, Ribeirão Preto. Proceedings of the Huanglongbing – Greening International Workshop, 2006, p.17.

- WULFF, N.; FASSINI, C. G.; MARQUES, V. V.; MARTINS, E. E.; COLETTI, D. A. B.; TEIXEIRA, D. C.; SANCHES, M. M.; BOVÉ, J. M. Molecular characterization and detection of 16SrIII group phytoplasma associated with Huanglongbing symptoms. *Phytopathology*. DOI: 10.1094/PHYTO-03-18-0081-R - "First Look" paper, 2019.
- WULFF, N. A.; ZHANG, S.; SETUBAL, J.; ALMEIDA, N. F.; MARTINS, E. C.; HARAKAVA, R.; KUMAR, D.; RANGEL, L. T.; FOISSAC, X.; BOVÉ, J. M.; GABRIEL, D. W. The complete genome sequence of *Candidatus Liberibacter americanus*, associated with Citrus Huanglongbing. *Molecular Plant Microbe Interactions*, v. 27, n. 2, p. 163-176, 2014.
- XU, L.; MO, K.; RAN, D.; MA, J.; ZHANG, L.; SUN, Y.; LONG, Q.; JIANG, G.; ZHAO, X.; ZOU, X. An endolysin gene from *Candidatus Liberibacter asiaticus* confers dual resistance to huanglongbing and citrus canker. *Hortic Res.*, v. 10, n. 9, 2023
- YAMAMOTO, P. T.; FELIPPE, M. R.; GARBIM, L. F.; COELHO, J. H. C.; XIMENES, N. L.; MARTINS, E. C.; LEITE, A. P. R.; SOUSA, M. C.; ABRAHÃO, D. P.; BRAZ, J. D. (2006). *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae): vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter americanus*. In: Proceedings of the Huanglongbing-Greening International Workshop, 2006, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, p. 96.
- ZHANG, S.; FLORES-CRUZ, Z.; ZHOU, L.; KANG, B.; FLEITES, L. A.; GOOCH, M. D.; WULFF, N. A.; DAVIS, M. J.; DUAN, Y.; GABRIEL, D. W. 'Ca. *Liberibacter asiaticus*' carries an excision plasmid prophage and a chromosomally integrated prophage that becomes lytic in plant infections. *MPMI (Molecular Plant-Microbe Interactions)*, v. 24, n. 4, p. 458-468, 2011.
- ZHENG, Z.; BAO, M.; WU, F.; CHEN, J.; DENG, X. Predominance of single prophage carrying a CRISPR/Cas system in *Candidatus Liberibacter asiaticus* strains in southern China. *PLoS ONE*, v. 11, n. 1, 2016.
- ZHENG, Z.; SUN, X.; DENG, X.; CHEN, J. Whole-genome sequence of *Candidatus Liberibacter asiaticus* from a Huanglongbing-affected citrus tree in central Florida. *Genome Announcements*, v. 3, 2015.
- ZHOU, L.; POWELL, C. A.; HOFFMAN, M. T.; LI, M.; 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. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 77, 6663–6673, 2011.

CAPÍTULO 2

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE POTENCIAIS BACTERIOCINAS (SC1_gp060 E lam_678) E LISOZIMAS (CLIBASIA_04790 E ED07_RS0204515) POR EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM *Escherichia coli*

RESUMO

Genes cujos produtos tenham toxicidade estão presentes em genomas de bactérias e podem desempenhar um papel fundamental na interação entre esses microrganismos e seus hospedeiros e conferir vantagens seletivas contra bactérias associadas. No presente trabalho, foram estudadas as possíveis bacteriocinas SC1_gp060 isolado '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (CLas) 2PA, SC1_gp060 isolado CLas Poona e lam_678 isolado '*Ca. Liberibacter americanus*' (CLam) São Paulo, além das formas da lisozima CLIBASIA_04790 isolado CLas 4PA e ED07_RS0204515 isolado CLas 3PA. A indução da expressão foi realizada em meio líquido e em meio sólido em células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS utilizando sistema de expressão heterólogo. Os experimentos mostraram que ao serem expressos SC1_gp060 Poona, CLIBASIA_04790 e ED07_RS0204515 exibiram efeito tóxico, reduzindo o crescimento das células hospedeiras em meio líquido em 70%, 54% e 73% respectivamente quando comparado com os controles. Ainda, em meio sólido, resultados de inibição de crescimento também foram observados. As proteínas identificadas por meio de western blot tiveram tamanho condizentes com o esperado, com exceção de SC1_gp060 2PA e lam_678, que possivelmente sofrem clivagem por proteases ao serem produzidas na forma heteróloga em *E. coli*. Por outro lado, SC1_gp060 Poona possui 4 resíduos de aminoácidos, KAEK, que lhe confere maior efeito de toxicidade. As predições das conformações terciárias e domínios conservados das proteínas foram condizentes com possível função: SC1_gp060 apresentou conformação de uma transferase e domínio conservado TolA box e CLIBASIA_04790 e ED07_RS0204515 apresentam conformação de muramidase/lisozima e domínio semelhante a lisozima. A exceção é lam_678 que com base nos domínios conservados e conformação apresentados parece ser uma proteína relacionada a ciclo celular. Adicionalmente, SC1_gp060 Poona e ED07_RS0204515 foram identificadas por western blot no interior das células de *E. coli*, indicando não serem secretadas. A bacteriocina SC1_gp060 e as lisozimas ED07_RS0204515 e CLIBASIA_04790 demonstram ser potenciais agentes antibacterianos para o controle de liberibactérias em citros.

Palavras chave: Huanglongbing, *Candidatus Liberibacter*, bacteriocinas, lisozimas, profagos, expressão heteróloga

**INVESTIGATION OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF POTENTIAL
BACTERIOCINS (SC1_gp060 AND lam_678) AND LYSOZYMES
(CLIBASIA_04790 AND ED07_RS0204515) THROUGH HETEROLOGOUS
EXPRESSION IN ESCHERICHIA COLI**

ABSTRACT

Genes whose products exhibit toxicity are present in bacterial genomes and can play a crucial role in the interaction between these microorganisms and their hosts, providing selective advantages against associated bacteria. In this study, potential bacteriocins SC1_gp060 from '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (CLas) isolate 2PA, SC1_gp060 from CLas Poona isolate, and lam_678 from '*Ca. Liberibacter americanus*' (CLam) São Paulo isolate, as well as forms of lysozymes CLIBASIA_04790 from CLas isolate 4PA and ED07_RS0204515 from CLas isolate 3PA, were investigated. Expression induction was carried out in liquid and solid media in *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS cells using a heterologous expression system. The experiments revealed that when expressed, SC1_gp060 Poona, CLIBASIA_04790, and ED07_RS0204515 exhibited a toxic effect, reducing the growth of host cells in liquid medium by 70%, 54%, and 73%, respectively, compared to controls. Furthermore, growth inhibition results were also observed in solid medium. The proteins identified through western blot had sizes consistent with expectations, except for SC1_gp060 2PA and lam_678, which possibly undergo protease cleavage when produced in a heterologous form in *E. coli*. On the other hand, SC1_gp060 Poona has 4 amino acid residues, KAEK, which confer greater toxicity. Predictions of the tertiary conformations and conserved domains of the proteins were consistent with possible functions: SC1_gp060 presented the conformation of a transferase and a conserved TolA box domain, while CLIBASIA_04790 and ED07_RS0204515 exhibited the conformation of muramidase/lysozyme and a domain similar to lysozyme. An exception is lam_678, which, based on the conserved domains and conformation presented, appears to be a protein related to the cell cycle. Additionally, SC1_gp060 Poona and ED07_RS0204515 were identified by western blot inside *E. coli* cells, indicating that they are not secreted. The bacteriocin SC1_gp060 and the lysozymes ED07_RS0204515 and CLIBASIA_04790 demonstrate potential antibacterial agents for the control of liberibacteria in citrus.

Keywords: Huanglongbing, *Candidatus Liberibacter*, bacteriocins, lysozymes, prophages, heterologous expression

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a presença de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (CLas) e '*Candidatus Liberibacter americanus*' (CLam), duas espécies associadas ao HLB, tem causado danos significativos à indústria de citros (COLLETA-FILHO et al., 2004; BELASQUE-JUNIOR et al., 2009; GOTTWALD et al., 2010; BASSANEZI et al., 2020; ALQUÉZAR et al., 2022). Uma vez que não existe cura para a doença, os esforços estão concentrados no manejo eficaz da doença e do vetor, bem como na identificação de possíveis alvos para o desenvolvimento de plantas resistentes à doença (PEÑA et al., 2008; HUANG et al., 2021; ALVES et al., 2021).

Nos genomas de CLas e CLam foram caracterizados profagos. No profago SC1 de CLas foram encontrados possíveis genes de lise bacteriana tais como holina e endolisina (FLEITES et al., 2014). Além disso fora da região do profago foram anotadas lisozimas (CLIBASIA_04790 e ED07_RS0204515). O profago SC1 codifica uma possível bacteriocina do tipo colicina (SC1_gp060) dentre os genes tardios e o profago SC2 codifica uma possível proteína de imunidade (SC2_gp255), garantindo assim proteção às células hospedeiras no caso de expressão da bacteriocina (ZHANG et al., 2011). No caso do profago SP1 de CLam, uma proteína semelhante à SC1_gp060, lam_678, foi identificada, sugerindo a presença de uma possível bacteriocina (WULFF et al., 2014). No entanto, não foi encontrada nenhuma proteína semelhante a SC2_gp255, a proteína de imunidade, no profago SP2. A expressão de bacteriocinas pode conferir vantagem adaptativa à bactéria produtora e portadora da proteína de imunidade. Enquanto que as células que não possuem a proteína de imunidade são suscetíveis. No caso de bactérias fastidiosas como *Liberibacter* e *Xylella*, o patógeno pode obter essa vantagem com a expressão de bacteriocinas e sobressair frente às demais populações da própria espécie, de espécies proximamente relacionadas, como entre liberibactérias no caso de CLas e CLam, ou frente a outras populações bacterianas, como os endofíticos (ARAÚJO et al., 2002) ou bactérias que habitam os insetos vetores (SUBANDIYAH et al., 2000; GUIDOLIN; CÔNSOLI, 2013).

Acredita-se que a expressão da bacteriocina do profago de CLas possa favorecer a predominância de CLas sobre CLam através do efeito direto desta sobre as células de CLam: as células de CLam seriam sensíveis à bacteriocina de CLas e em situações onde ocorre coinfeção com CLas e CLam, tanto na planta quanto no

inseto vetor, resulta na morte das células de CLam, reduzindo a presença e consequente disseminação desta espécie. Outra característica importante a ser mencionada é o fato de que no genoma de CLam foi anotada uma proteína com similaridade a SC1gp_060, porém essa espécie não tem a proteína de imunidade à colicina no profago (WULFF et al., 2014). Portanto, não é esperado que as células de CLam produzam e secretem bacteriocinas, com possível desvantagem adaptativa em relação a CLas. Essa hipótese ganhou força quando, em condições controladas, plantas de laranja doce infectadas simultaneamente com CLas e CLam apresentaram o mesmo perfil de mudança observado no campo (DAROLT, 2021) e um estudo prévio constatou o efeito tóxico destes genes (DUTRA, 2018). Supõem-se que, entre os fatores que afetam a multiplicação e a disseminação de CLas e CLam, como temperatura, multiplicação e aquisição pelo inseto (LOPES et al., 2009a e b; NASCIMENTO, 2010), pode haver uma competição direta entre essas duas espécies.

No presente estudo, genes que codificam para bacteriocinas, SC1_gp060 isolado CLas 2PA, SC1_gp060 isolado CLas Poona, lam_678 isolado CLam São Paulo e lisozimas, CLIBASIA_04970 isolado CLas 4PA e ED07_RS0204515 isolado CLas 3PA, foram avaliados em um sistema de expressão heteróloga em meio líquido e sólido. Os resultados obtidos evidenciam toxicidade de SC1_gp060 Poona, CLIBASIA_04790 e ED07_RS0204515 em células de *E. coli* BL21 (DE3) PLysS, o que os coloca como candidatos promissores para futuras aplicações no controle do HLB.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito antibacteriano da expressão das possíveis bacteriocinas SC1_gp060 Poona, SC1_gp060 2PA e lam_678, bem como das lisozimas CLIBASIA_04790 e ED07_RS0204515, em células de *E. coli*.

2.3 Objetivos específicos

- I) Avaliar o crescimento de células de *E. coli* BL21 contendo os genes de interesse através de expressão heteróloga em meio líquido e sólido;
- II) Analisar as sequências das proteínas estudadas utilizando ferramentas de bioinformática para predição de sítios de clivagem, domínio conservado, estrutura terciária e sinal de secreção;
- III) Identificar as proteínas produzidas por SDS-PAGE e Western-blot;

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos descritos a seguir foram conduzidos no laboratório de Pesquisa e Diagnóstico do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento do Fundecitrus, o qual conta com Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB), concedido pela CTNBio. O Laboratório está localizado na cidade de Araraquara, estado de São Paulo, Brasil.

3.1 Microrganismos, vetores de expressão, meios de cultura e condições de cultivo

No presente estudo a linhagem bacteriana de *E. coli* BL21(DE3) pLysS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) foi utilizada como hospedeira para as construções plasmidiais obtidas. Os plasmídeos utilizados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos vetores e construções gênicas

Vetores/ construções	Características	Marca de resistência	Referência
pET28a	5,3 kpb; vetor de expressão, T7 promoter, Can ^R	Canamicina	Novagen
pMD13	SC1_gp060 2PA (bacteriocina isolado CLas 2PA) em pET28a	Canamicina	DUTRA, 2018
pMD14	lam_678 (bacteriocina isolado CLam São Paulo) em pET28a	Canamicina	DUTRA, 2018
pMD15	CLIBASIA_04790 ((lisozima isolado CLas 4PA) em pET28a	Canamicina	DUTRA, 2018
pMD16	SC1_gp060 Poona (bacteriocina isolado CLas Poona) em pET28a	Canamicina	DUTRA, 2018
pMD17	ED07_RS0204515 (lisozima isolado CLas 3PA) em pET28a	Canamicina	DUTRA, 2018
pMD18	Fragmento 831 pb proveniente de S2 (Fitoplasma grupo IX) em pET28a	Canamicina	DUTRA, 2018

Fonte: a autora

A linhagem BL21 foi cultivada em meio Lysogeny Broth (LB) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 2012) líquido ou sólido e incubada à temperatura de 37 °C com ou sem agitação à 250 rpm, por períodos que variaram entre 5 a 24 h. Os antibióticos canamicina (seleção de células contendo as construções de interesse em pET28a) e cloranfenicol (seleção das cepas de BL21) foram adicionados nas concentrações

finais de 50 µg/ mL e 30 µg/ mL respectivamente ao meio LB quando necessário. Para a solidificação do meio LB, ágar bacteriológico foi adicionado a 1%.

3.2 Atividade antibacteriana das potenciais bacteriocinas e lisozimas em células de *Escherichia coli* BL21

3.2.1 Expressão heteróloga de SC1_gp060, lam_678, CLIBASIA_04790 e ED07_RS0204515 em meio líquido

Construções plasmidiais listadas na Tabela 1, a saber: pMD13 (SC1_gp060 2PA), pMD14 (lam_678), pMD15 (CLIBASIA_04790), pMD16 (SC1_gp060 Poona), pMD17 (ED07_RS0204515) e pMD18 (Fragmento 831 pb proveniente de S2, um controle de gene não tóxico), foram obtidas previamente por DUTRA (2018). Todas essas construções contêm o promotor T7, que pode ser induzido pela adição de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) ao meio de cultura. Células de *E. coli* BL21 eletrocompetentes foram transformadas com as construções plasmidiais mencionadas, seguindo o procedimento descrito por SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS (2012). A seleção das colônias transformantes foi feita em placas contendo meio LB sólido e posteriormente cultivadas em 5 mL de meio LB líquido na presença de canamicina e cloranfenicol. Culturas controle de *E. coli* sem o vetor pET28a foram cultivadas em meio LB somente com cloranfenicol e seguiu o mesmo procedimento descrito anteriormente. As culturas foram mantidas à 37 °C por aproximadamente 16h com agitação constante. Após crescimento, alíquotas foram retiradas para leitura na densidade óptica OD₆₀₀ em espectrofotômetro Genesys 30 (Thermo Fisher Scientific). Um volume de 400 µL de cultura com OD₆₀₀ ajustada para 1,0 foi transferido para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 40 mL de meio LB. Ao meio de cultivo adicionou-se canamicina e cloranfenicol, com exceção do que continha somente *E. coli* BL21 o qual adicionou-se somente cloranfenicol. O procedimento foi realizado em triplicata. Retirou-se alíquotas para a medição da OD₆₀₀ do tempo inicial (Ti) e em seguida as culturas foram levadas à 37 °C sob agitação. Após 2 h de crescimento, foi retirada a primeira alíquota, chamada de não induzido (T0), quando adicionou-se IPTG na concentração final de 0,5 mM para início da indução da expressão. Foram realizadas leituras de OD₆₀₀ e retiradas de alíquotas de 1 mL para posteriores análises de SDS-PAGE e Western-Blot em intervalos de 1h, até 5 h. O experimento foi repetido

três vezes. Os valores de OD₆₀₀ obtidos foram utilizados para o cálculo de variância, comparação de médias e cálculo do erro padrão com o auxílio do programa R (Versão 3.5.0).

3.2.2 Indução e repressão da expressão heteróloga de SC1_gp060 e ED07_RS0204515 em meio sólido

O crescimento de células de *E. coli* BL21 produzindo SC1_gp060 e ED07_RS0204515 em meio sólido foi avaliado. Colônias isoladas resultantes da transformação das construções pET28a, pMD19, pMD16 e pMD17 foram inoculadas em meio LB contendo canamicina e cloranfenicol. O crescimento das colônias se deu sob agitação a 37 °C por aproximadamente 16 horas. Em uma microplaca de 96 poços contendo 180 µL de meio LB em cada poço, 20 µL de culturas com OD₆₀₀ ajustada para 1,0 (10^{-1}) foram adicionados ao primeiro poço. Em seguida, uma diluição seriada foi realizada até 10×10^{-12} . Ao final, 5 µL de cada diluição foram depositados na superfície de meio LB sólido (100 mL de meio LB em placas de Petri com a adição dos antibióticos canamicina e cloranfenicol previamente preparados). Para indução ou repressão da expressão das proteínas, foram adicionados 0,5 mM de IPTG ou 0,2% de glicose ao meio de cultura, respectivamente. Além disso, alíquotas das culturas previamente ajustadas (OD₆₀₀ 1,0) foram espalhadas por esgotamento em placas contendo os antibióticos, IPTG ou glicose, conforme descrito anteriormente. Todas as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 18 horas.

3.3 Ensaio de secreção de SC1_gp060 e ED07_RS0204515 em *Escherichia coli*

Para avaliar se as proteínas correspondentes aos genes de CLas SC1_gp060 Poona e ED07_RS0204515 são secretadas quando expressas em *E. coli* BL21, ao final dos ensaios de indução da expressão descritos anteriormente, as culturas foram submetidas a centrifugação (2700 g por 15 min a 4 °C) para separação do precipitado de células (P) e do sobrenadante (S). O sobrenadante foi coletado e liofilizado utilizando um equipamento SL-404 (SOLAB, Piracicaba, São Paulo, Brasil). Posteriormente, tanto o precipitado quanto o sobrenadante foram homogeneizados em 5 mL de tampão de lise (50 mM tris-HCl pH 8,0; 300mM NaCl; 50 mM imidazol; 10% glicerol; 0,01% triton X-100; e 1mM fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF)). As

proteínas totais foram quantificadas por BRADFORD (1976) usando BSA (albumina de soro bovino) como padrão e separadas por eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Por fim realizou-se a análise de Western-Blot utilizando como anticorpo Anti-6x His tag (Merck Millipore Sigma, Darmstadt, Alemanha). O procedimento seguiu o descrito em SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS (2012).

3.4 Análises de Bioinformática

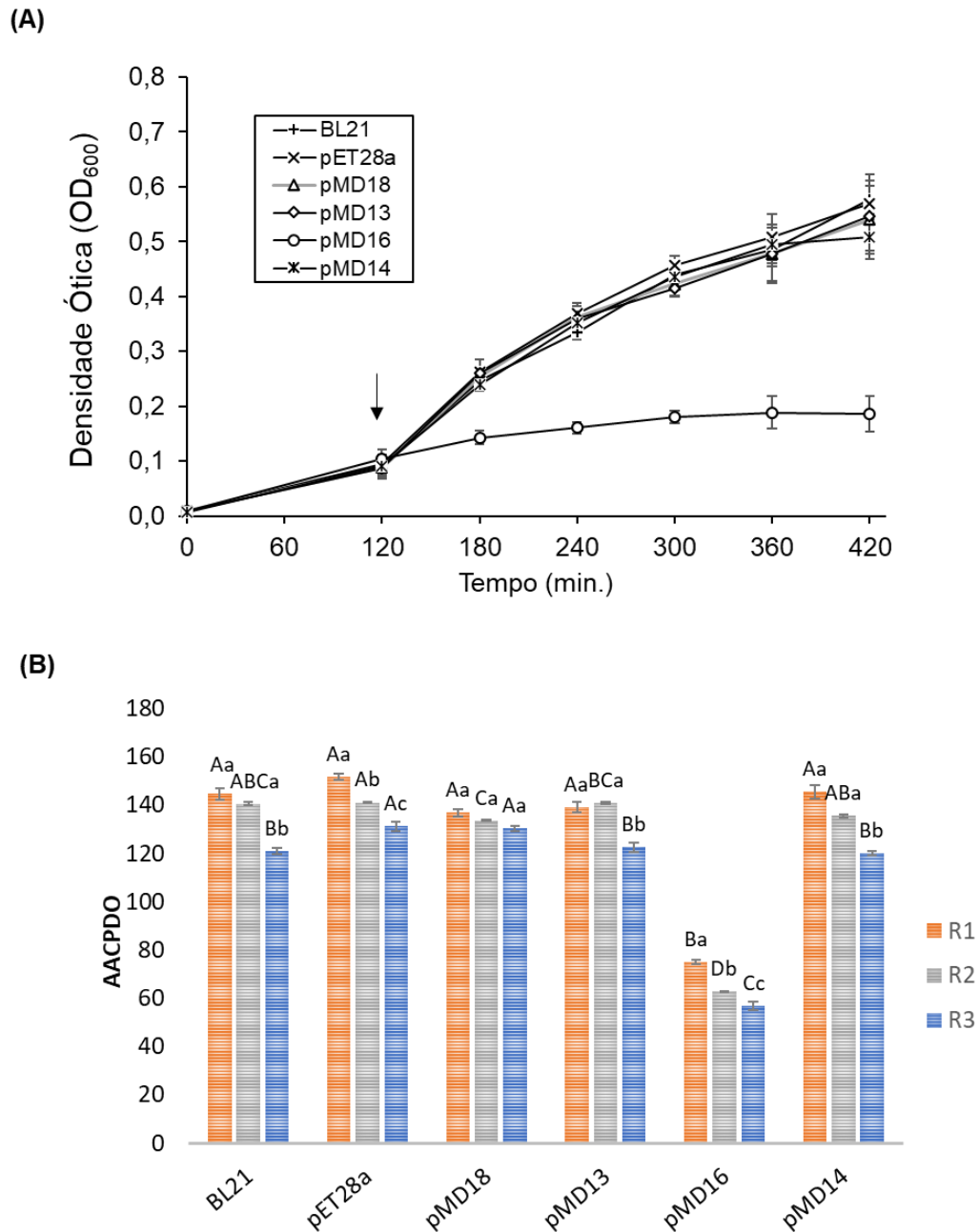
O peso molecular das proteínas foi determinado a partir da contagem de resíduos de aminoácidos, utilizando a ferramenta Protein Molecular Weight (https://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html). O alinhamento e a comparação dos resíduos foram conduzidos através do Clustal Omega - *Multiple Sequence Alignment* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Para identificar possíveis sítios de clivagem, empregamos a ferramenta PROSPER (<https://prosper.erc.monash.edu.au/home.html>). Domínios conservados foram identificados pela ferramenta *Conserved Domains* do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). A ferramenta Phyre2 foi utilizada para prever a conformação 3D das proteínas (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). Por fim, para a previsão de secreção e peptídeo sinal das proteínas estudadas recorreremos ao SecretomeP 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SecretomeP-2.0>).

4 RESULTADOS

4.1 Atividade antibacteriana de SC1_gp060, lam_678, CLIBASIA_04790 e ED07_RS0204515 em células de *Escherichia coli*

Os dados de OD₆₀₀ das culturas, obtidos neste estudo, são consistentes com resultados anteriores de DUTRA (2018). A cinética de crescimento da *E. coli* BL21 (Figuras 6 e 7) mostra que, após a indução da expressão com IPTG, houve uma estagnação no crescimento das células transformadas com pMD15 (CLIBASIA_04790), pMD16 (SC1_gp060 Poona) e pMD17 (ED07_RS0204515). Quando comparadas com as culturas das células transformadas com construções controle ou sem construção essa diferença é de aproximadamente 54%, 70% e 73% respectivamente. Tais resultados reforçam o efeito antibacteriano destas proteínas. Por outro lado, as células transformadas com pMD13 e pMD14 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação aos controles, indicando que não causaram efeitos tóxicos quando houve indução da expressão.

Figura 6. Cinética de crescimento **(A)** e Área Abaixo da Curva do Progresso da Densidade Óptica **(B)** de células de *E. coli* BL21 expressando colicinas SC1_gp060 2PA, SC1_gp060 Poona e lam_678

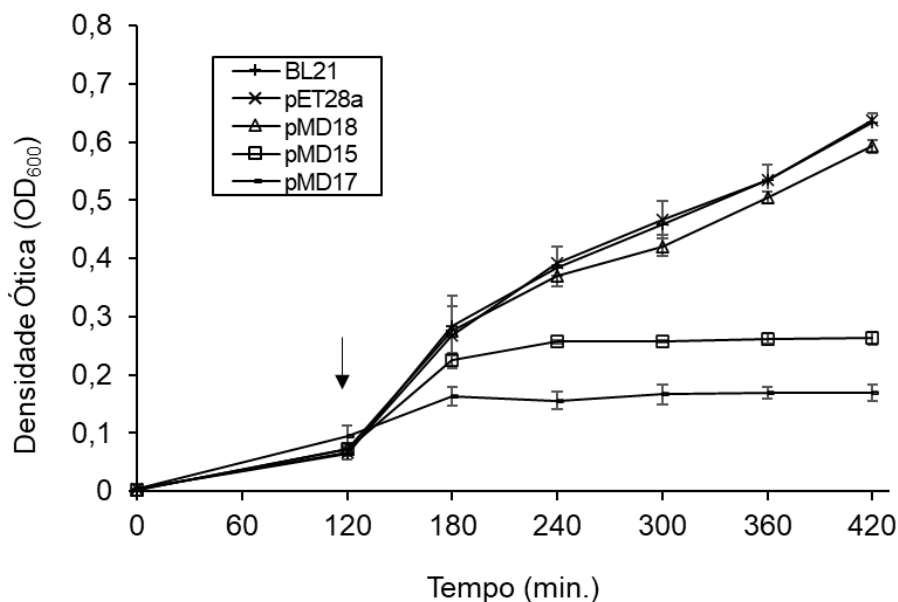


Na imagem **(A)** está a cinética de crescimento bacteriano enquanto que em **(B)** encontra-se a Área Abaixo da Curva do Progresso de Densidade Óptica AACPDO para repetições R1, R2 e R3. A seta indica o momento da indução da expressão com IPTG. O erro padrão foi calculado com base nas médias. Letras maiúsculas se referem a comparação nos diferentes tratamentos. Letras minúsculas correspondem a comparação dentro do mesmo tratamento (entre as repetições R1, R2 e R3). BL21: controle *E. coli* BL21 sem vetor/ plasmídeo; pET28a: controle de vetor vazio; pMD18: controle de gene não tóxico; pMD13: SC1_gp060 2PA; pMD16: SC1_gp060 Poona; pMD14: lam_678 CLam Sao Paulo.

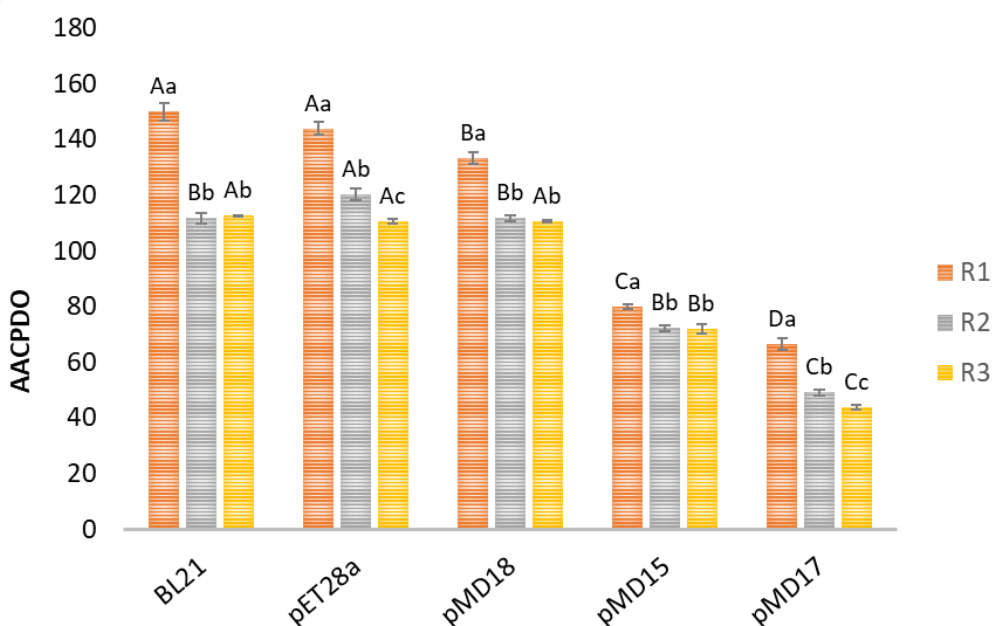
Fonte: a autora

Figura 7. Cinética de crescimento **(A)** e Área Abaixo da Curva do Progresso da Densidade Óptica **(B)** de células de *E. coli* BL21 expressando lisozimas ED07_RS0204515 e CLIBASIA_04790.

(A)



(B)

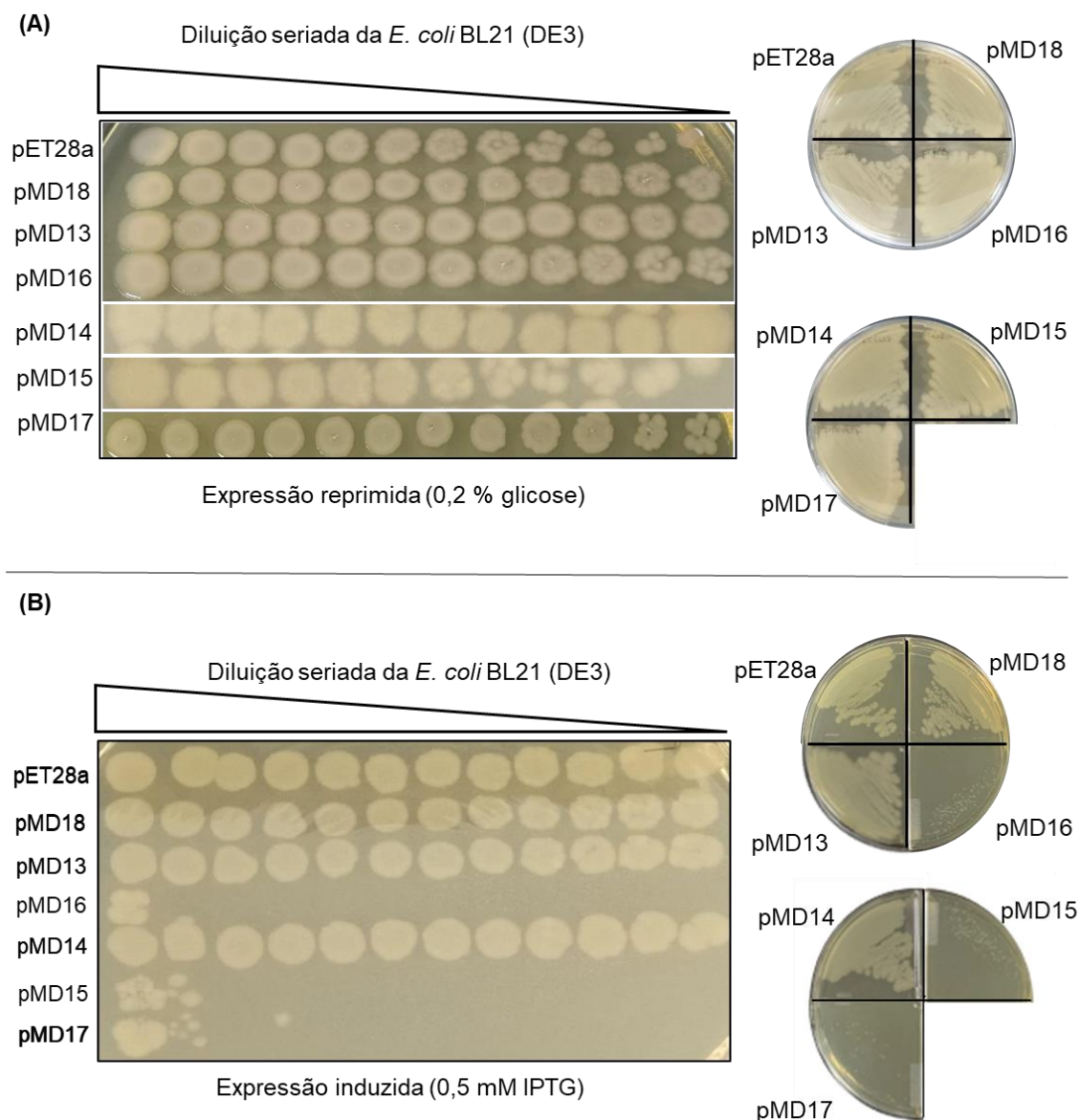


Em (A) está indicada a cinética de crescimento enquanto que em (B) encontra-se a Área Abaixo da Curva do Progresso da Densidade Óptica AAPDO para repetições R1, R2 e R3. A seta indica o momento da indução da expressão com IPTG. O erro padrão foi calculado com base nas médias. Letras maiúsculas se referem a comparação nos diferentes tratamentos. Letras minúsculas correspondem a comparação dentro do mesmo tratamento (entre as repetições R1, R2 e R3). BL21: controle *E. coli* BL21 sem vetor/ plasmídeo; pET28a: controle de vetor vazio; pMD18: controle de gene não tóxico; pMD17: ED07_RS0204515; pMD15: CLIBASIA_04790.

Fonte: a autora

Em meio sólido os resultados foram similares ao obtido em meio líquido. Quando a expressão de SC1_gp060 Poona (pMD16), CLIBASIA_04790 (pMD15) e ED07_RS0204515 (pMD17) foi induzida através da adição de IPTG, houve inibição do crescimento de *E. coli* BL21 (Figura 8B). A partir da segunda diluição para as células transformadas com pMD16 (10^{-2}) e da terceira diluição para as células transformadas com pMD15 e pMD17 (10^{-3}), quando houve indução por IPTG para a expressão de suas respectivas proteínas, não houve crescimento das bactérias, consistente com o efeito antibacteriano ocasionado pela bacteriocina (pMD16) e lisozimas (pMD15 e pMD17). Por outro lado, no caso de SC1_gp060 2PA (pMD13) e lam_678 (pMD14), a produção dessas proteínas não interferiu no crescimento das células hospedeiras, apresentando um comportamento idêntico aos controles pET28a e pMD18, assim como também observado no experimento realizado em meio líquido. Com relação a repressão da expressão das proteínas de interesse, os resultados foram consistentes com o esperado, onde a expressão foi reprimida pela presença de glicose. Esse é um mecanismo de regulação gênica comum em organismos, como bactérias e leveduras (Figura 8A).

Figura 8. Diluição seriada (10^{-1} a 10^{-12}) de culturas de *Escherichia coli* BL21 transformadas com pET28a, pMD18, pMD13, pMD16, pMD14, pMD15 e pMD17



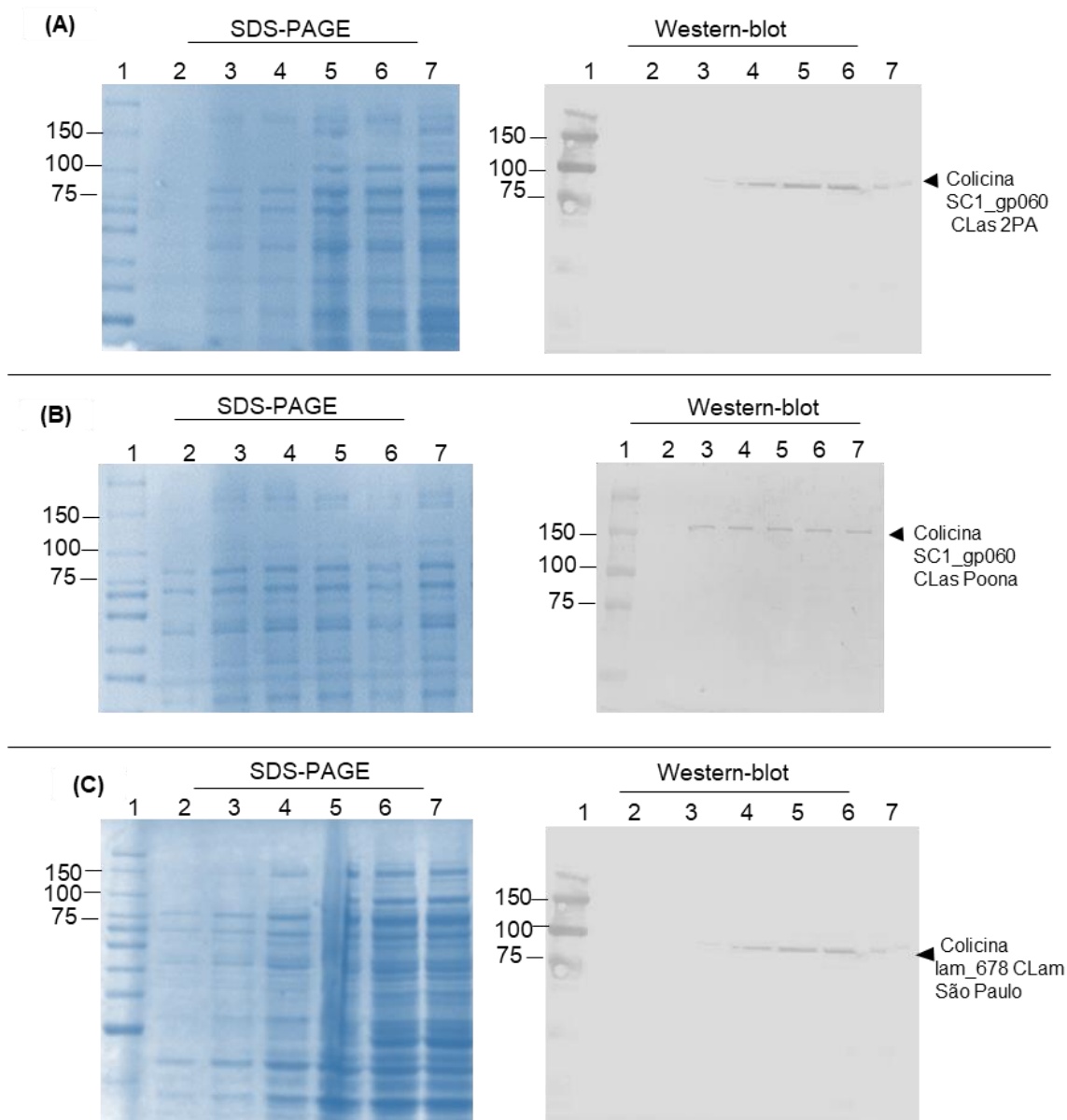
A adição de 0,2% de glicose (A) ou 0,5 mM de IPTG (B) ao meio LB sólido reprimiu e induziu, respectivamente, a expressão das proteínas recombinantes. BL21: controle *E. coli* BL21 sem vetor/plasmídeo; pET28a: controle de vetor vazio; pMD18: controle de gene não tóxico; pMD13: SC1_gp060 2PA, pMD16: SC1_gp060 Poona, pMD14: lam_678, pMD15: CLIBASIA_04790. e pMD17: ED07_RS0204515. Em A e B, as diluições empregadas foram (10^{-1}) foram adicionados ao primeiro poço à esquerda da figura. Em seguida, uma diluição seriada foi realizada até 10×10^{-12} (extremidade à direita).

Fonte: a autora

4.2. Identificação de SC1_gp060, lam_678, CLIBASIA_04790 e ED07_RS0204515 por Western-blot

Análises de SDS-PAGE e Western-blot realizadas com alíquotas retiradas durante a execução do experimento indicaram que as proteínas recombinantes foram expressas nas células de *E. coli* BL21 (Figuras 9 e 10). O tamanho esperado para as colicinas de acordo com o número de resíduos é 154 kDa para SC1_gp060 2PA e SC1_gp060 Poona e 153 kDa para lam_678. As lisozimas são de 12 kDa e 20 kDa, respectivamente, para ED07_RS0204515 e CLIBASIA_04790. A Figura 9B mostra que a proteína correspondente a SC1_gp060 Poona apresenta o tamanho esperado, no entanto SC1_gp060 2PA e lam_678, (9A e 9C) apresentam tamanho que se entropõe entre 75 e 100 kDa caracterizando diferenças entre os resultados esperados e obtidos. As proteínas correspondentes a ED07_RS0204515 e CLIBASIA_04790 apresentam tamanhos de acordo com o esperado.

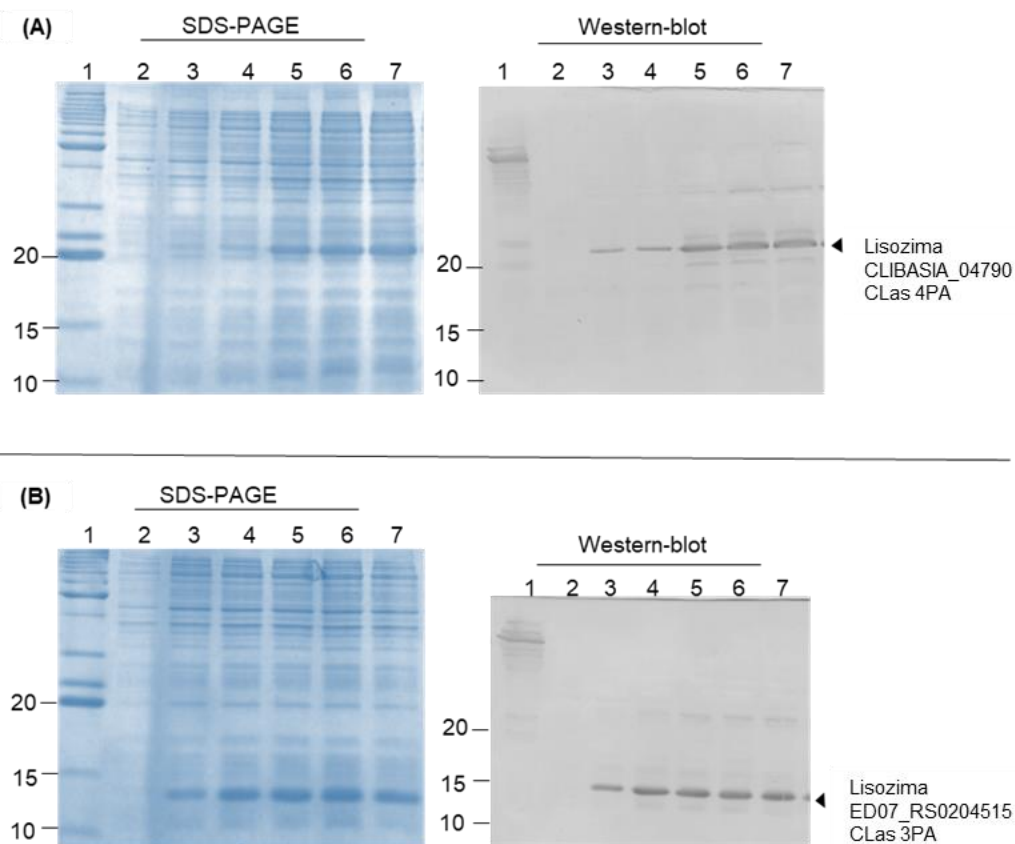
Figura 9. SDS-PAGE e Western-Blot do conteúdo proteico total de células de *Escherichia coli* BL21 produzindo (A) SC1_gp060 2PA (pMD13), (B) SC1_gp060 Poona (pMD16) e (C) lam_678 (pMD14).



Em (A), (B) e (C) as canaletas 2, 3, 4, 5, 6 e 7 referem-se respectivamente aos tempos de indução T0 (não induzido), T1 (uma hora), T2 (duas horas), T3 (três horas), T4 (quatro horas) e T5 (cinco horas). A canaleta 1 em (A), (B) e (C) refere-se ao marcador molecular Benchmark™ (SDS-PAGE) (Invitrogen – Thermo Fisher Scientific) ou Precision Plus Protein™ Dual Color Standards - Western-Blot (Bio Rad - Hercules, Califórnia, Estados Unidos). O gel está concentrado à 8%. Utilizou-se anticorpo Anti-6x His tag.

Fonte: a autora

Figura 10. SDS-PAGE e Western-Blot do conteúdo proteico total de células de *Escherichia coli* BL21 produzindo (A) CLIBASIA_04790 (pMD15) e (B) ED07_RS0204515 (pMD17).



Em (A) e (B) as canaletas 2, 3, 4, 5, 6 e 7 referem-se respectivamente aos tempos de indução T0 (não induzido), T1 (uma hora), T2 (duas horas), T3 (três horas), T4 (quatro horas) e T5 (cinco horas). A canaleta 1 em (A) e (B) indica o marcador molecular Benchmark™ (Invitrogen – Thermo Fisher Scientific) (SDS-PAGE) ou Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio Rad) (Western-Blot). O gel está concentrado à 15%. Utilizou-se anticorpo Anti-6x His tag.

Fonte: a autora

4.3 Análises de bioinformática das bacteriocinas de CLas e CLam

Ao comparar as sequências dos resíduos de aminoácidos de SC1_gp060 2PA com SC1_gp060 Poona, é evidente a presença de três diferenças significativas entre ambas. Além disso, ao compará-las com a sequência de SC1_gp060 do profago SC1 do isolado UF506 (GenBank: HQ377372.1), também são observadas variações notáveis. A Figura 11 ilustra a comparação da estrutura primária de SC1_gp060 dos isolados CLas Poona, 2PA e UF506, nas principais discrepâncias entre as proteínas comparadas. Essa região de comparação abrange a posição 481 a 653, dos 1354 resíduos no total. É importante destacar que as diferenças observadas não afetam o quadro aberto de leitura dos genes.

Figura 11. Alinhamento das sequências de aminoácidos de SC1_gp060 Poona, CLas 2PA e CLas UF506 (SC1_gp60)

CLas_Poona	ELKQATVLARANAQEEKQRREQEAEKADREKADKEAKEKADREKADK EAQEKAKEA QE	540
CLas_2PA	ELKQATVLARANAQEEKQRREQEAEK D DREKADKEAKEKADREKADK-----ELQE	532
CLas_UF506	ELKQATVLARANAQEEKQRREQEAEKADREKADKEAKEKADREKADK-----DLQE	532
	***** : **	
CLas_Poona	KTPIKAEGDDFGLGLP P VPTHSVKLPPKEEELEE VKEEVEPA KDE-----GTTETDDR	593
CLas_2PA	KTPIKAEGDDFGLGLPSVPTHSVKLPPKEEELEE VKEEAEP A KDEGKKGKEP GT TETDDR	592
CLas_UF506	KTPIKAEGDDFGLGLPSVPTHSVKLPPKEEELEE-----K DEGKKGKEP GT TETDDR	585
	***** ** *	
CLas_Poona	EETERKNQDILDNSLLAGKTHTKNET PV IPTAKAPPAQAHKGIQDKKPQDQREKPLASDI	653
CLas_2PA	EETERKNQDILDNSLLAGKTHTKNETPAIPTAKAPPAQAHKGIQDKKPQDQREKPLASDI	652
CLas_UF506	EETERKNQDILDNSLLAGKTHTKNETPAIPTAKAPPAQAHKGIQDKKPQDQREKPLASDI	645

O alinhamento compreende os resíduos 481-653. Traços (-) indicam ausência de aminoácidos; asteriscos (*) indicam posições que possuem o resíduo conservado entre as sequências comparadas; um ponto (.) indica conservação entre grupos de resíduos com propriedades semelhantes fracas; e dois pontos (:) indicam conservação entre os grupos de resíduos com propriedades semelhantes fortes. Em vermelho os resíduos ausentes e/ou diferentes no consenso. Os números indicados referem-se à sequência consenso do alinhamento gerado.

Fonte: Clustal Ômega, com modificações

SC1_gp060 Poona apresenta uma sequência de 8 resíduos de aminoácidos (EAQEKAEK) que não é encontrada nas sequências de SC1_gp060 UF506 e SC1_gp060 2PA. Por outro lado, essas últimas compartilham uma sequência de 7 resíduos em comum (GKKGKEP) que não está presente em SC1_gp060 Poona. Além disso, SC1_gp060 Poona e SC1_gp060 2PA compartilham uma sequência com um único resíduo diferente que não se encontra na proteína homóloga da estirpe UF506 (KEEVEPA e KEEAEPA respectivamente). É importante destacar que SC1_gp060 Poona, que demonstrou efeito tóxico quando expressa em células de *E. coli* BL21, possui duas variações em relação às suas homólogas: nas posições 547 e 621, há uma prolina (P) e uma valina (V), respectivamente, que são substituídas por uma serina (S) e uma alanina (A) em SC1_gp060 CLas UF506 e SC1_gp060 2PA.

Utilizando a ferramenta PROSPER, obteve-se possíveis sítios de clivagem nas proteínas estudadas para 24 diferentes famílias de proteases (Figura 12). Ao comparar esses resultados com as variações nos resíduos das diferentes bacteriocinas SC1_gp060 e com o tamanho das proteínas, que foi confirmado por Western-blot, chegamos à suposição de que provavelmente ocorre uma clivagem em SC1_gp060 2PA. Essa clivagem é desencadeada pela ação de uma serina-protease após o resíduo de glicina (G) na posição 578 (Score 1.01), conforme indicado na Figura 13. Como resultado dessa clivagem, a proteína apresenta um tamanho

aproximado de 93,44 kDa no fragmento C-terminal, o que está em conformidade com os resultados obtidos por Western-blot (Figura 9A).

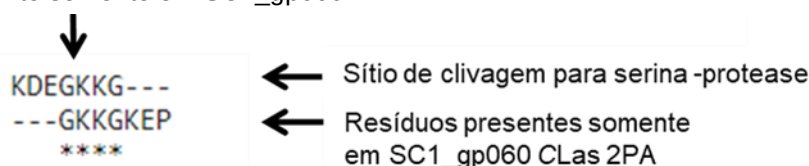
Figura 12. Predição de possíveis sítios de clivagem para a bacteriocina SC1_gp060 2PA

Position	Segment	Nfragment	Cfragment	Score
189	KDLK I EVGD	22.04 kDa	139.93 kDa	1.37
267	KDAF I RFLE	31.33 kDa	130.65 kDa	1.31
1039	ADAK I ENPN	123.93 kDa	38.04 kDa	1.19
397	NDWV I NGRV	46.87 kDa	115.11 kDa	1.13
120	EDVA I KTIT	13.68 kDa	148.29 kDa	1.10
744	SDKAL I NHF	88.47 kDa	73.50 kDa	1.09
700	KAWD I SYKE	83.04 kDa	78.94 kDa	1.07
995	ADLK I ELQT	118.71 kDa	43.26 kDa	1.06
227	KDEH I KINK	26.70 kDa	135.28 kDa	1.06
1086	EDFK I ASFE	129.66 kDa	32.31 kDa	1.04
754	NDFG I YYRI	89.76 kDa	72.21 kDa	1.03
1074	IDNA I YGLW	127.97 kDa	34.00 kDa	1.02
713	PDE I KQRF	84.60 kDa	77.37 kDa	1.01
105	IDYQ I TNNL	12.04 kDa	149.93 kDa	1.01
578	KDEG I KKGK	68.53 kDa	93.44 kDa	1.01
639	QDKK I PQDQ	75.65 kDa	86.32 kDa	1.00

O retângulo em vermelho indica o sítio de clivagem presente em SC1_gp060 2PA onde possivelmente ocorre uma proteólise por uma serina-protease.

Fonte: Prosper, com modificações

Figura 13. Alinhamento dos resíduos de aminoácidos relativos à região do possível sítio de clivagem e sequência presente somente em SC1_gp060 2PA.



A seta vertical indica o resíduo a partir do qual a possível clivagem ocorre. Traços (-) indicam ausência de aminoácidos; asteriscos (*) indicam posições que possuem o resíduo conservado entre as sequências comparadas.

Fonte: a autora

Utilizando a mesma ferramenta, ao analisar lam_678 CLam São Paulo, identificaram-se diversos sítios de clivagem. Portanto, acredita-se que algo semelhante ocorra com esta proteína (dados não mostrados).

Uma busca no Conserved Domains do NCBI revelou que SC1_gp060 2PA e SC1_gp060 Poona possuem um domínio conservado chamado de TolA box (Tabela 2 e Figura 14). Esse domínio, presente na porção N-terminal de alguns tipos de bacteriocinas, é de extrema importância para translocação dependente do sistema

Tol/Ton (Schneider et al., 1997). Já para lam_678 a busca resultou em três domínios: MAP7, PTZ00121 e Smc Chromosome segregation ATPase (Tabela 2).

Tabela 2. Lista de hits de domínios conservados para SC1_gp060 2PA, SC1_gp060 Poona e lam_678

Proteína	Nome	Acesso	Intervalo	E-value
SC1_gp060 2PA	tolA_full	TIGR02794	482-547	5.27e-04
SC1_gp060 Poona	tolA_full	TIGR02794	482-547	4.34e-08
	MAP7/ MAP7 superfamily	Pfam05672	503-610	1.39e-15
lam_678	PTZ00121	cl31754	494-744	3.36e-11
	Smc	cl34174	490-1090	7.18e-07

Fonte: a autora

Figura 14. Domínio conservado das proteínas SC1_gp060 Poona e SC1_gp060 2PA.

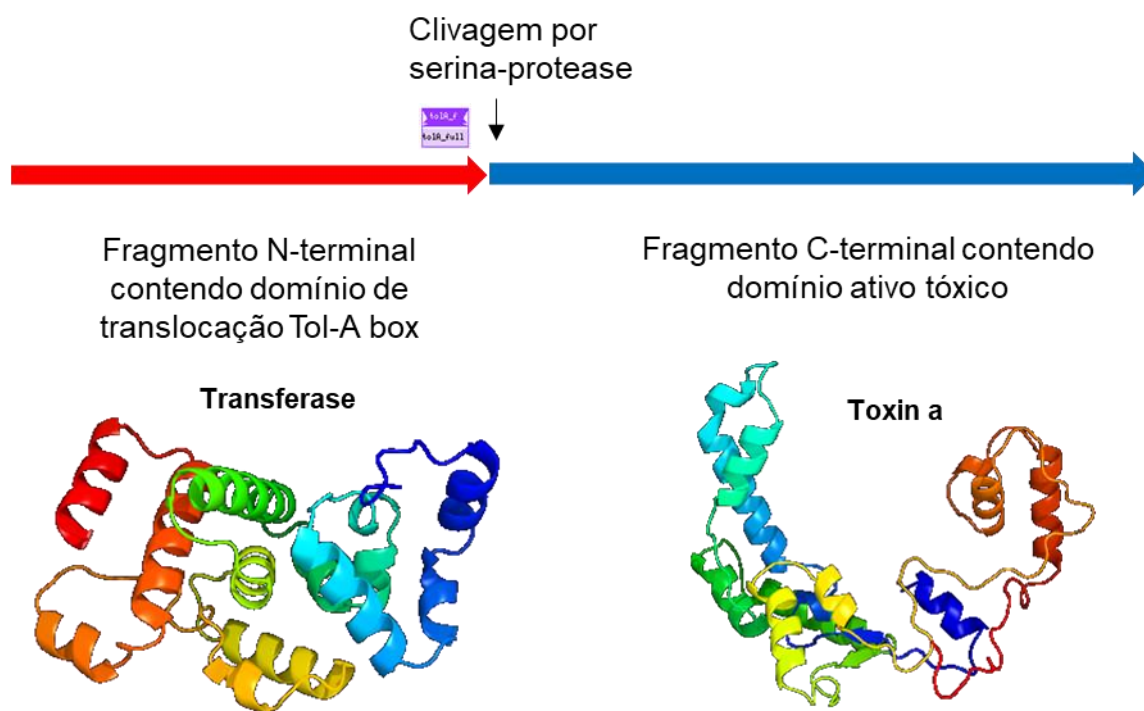


Os retângulos em vermelho indicam o local da possível quebra por uma serina-protease em um sítio de proteólise presente somente em SC1_gp060 2PA

Fonte: NCBI, com modificações

Quando a estrutura terciária (3D) destas proteínas foi predita, notou-se que, no caso de SC1_gp060 2PA e SC1_gp060 Poona, as porções N e C-terminais exibem semelhanças respectivamente com uma transferase de *Thermotoga maritima* (id c3wfrE, com 43,3% de confiança) e uma toxina a de *Clostridium difficile* (id c4r04A, com 39,4% de confiança) (Figura 15).

Figura 15. Predição de estrutura terciária (3D) de SC1_gp060 2PA e SC1_gp060 Poona.

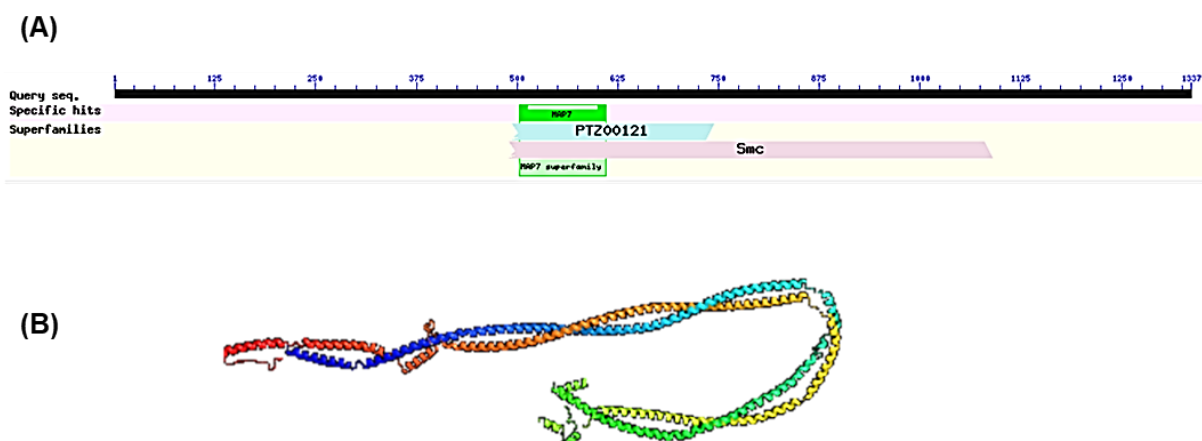


O retângulo roxo indica a presença do domínio conservado TolA box e a seta preta indica a posição de um possível sitio para serina-protease que ocorre somente em SC_gp060 CLas 2PA.

Fonte: a autora

É possível verificar que a clivagem que ocorre (resíduo 578) quebra a proteína em duas partes fazendo com que a porção C-terminal que contém os resíduos catalíticos se separe da porção N-terminal composta pelo domínio de translocação. Por outro lado, ao analisar a estrutura 3D de lam_678 (Figura 16), identificou-se semelhanças com proteínas relacionadas ao ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae* (id c6yvuB).

Figura 16. Domínio conservado **(A)** e Predição de estrutura terciária (3D) **(B)** de lam_678.



Os retângulos coloridos (verde claro, verde, azul claro e rosa em (A) indicam os domínios conservados de lam_678 (ver Tabela 2).

Fonte: a autora

4.4 Análises de bioinformática das lisozimas CLIBASIA_04790 e ED07_RS0204515

Como apontado previamente (DUTRA, 2018) CLIBASIA_04790 e ED07_RS0204515 possuem uma diferença única de 67 resíduos correspondente a porção N-terminal de CLIBASIA_04790 que não está presente em ED07_RS0204515. Ao analisar os domínios presentes nestas proteínas, verificou-se que ED07_RS024515 CLas 3PA, em comparação com CLIBASIA_04790, não possui três resíduos catalíticos presentes no domínio lyz-like superfamily (E, D e T). A conformação terciária predita destas duas proteínas também difere apesar de terem basicamente a mesma função: CLIBASIA_04790 exibiu identidade com uma proteína antimicrobiana do tipo lisozima (confiança de 100 % e 95 % de cobertura) e ED07_RS0204515 exibiu identidade com uma hidrolase do tipo muramidase (confiança de 100 % e 95 % de cobertura) (Figura 17), portanto ambas com similaridade de ação enzimática.

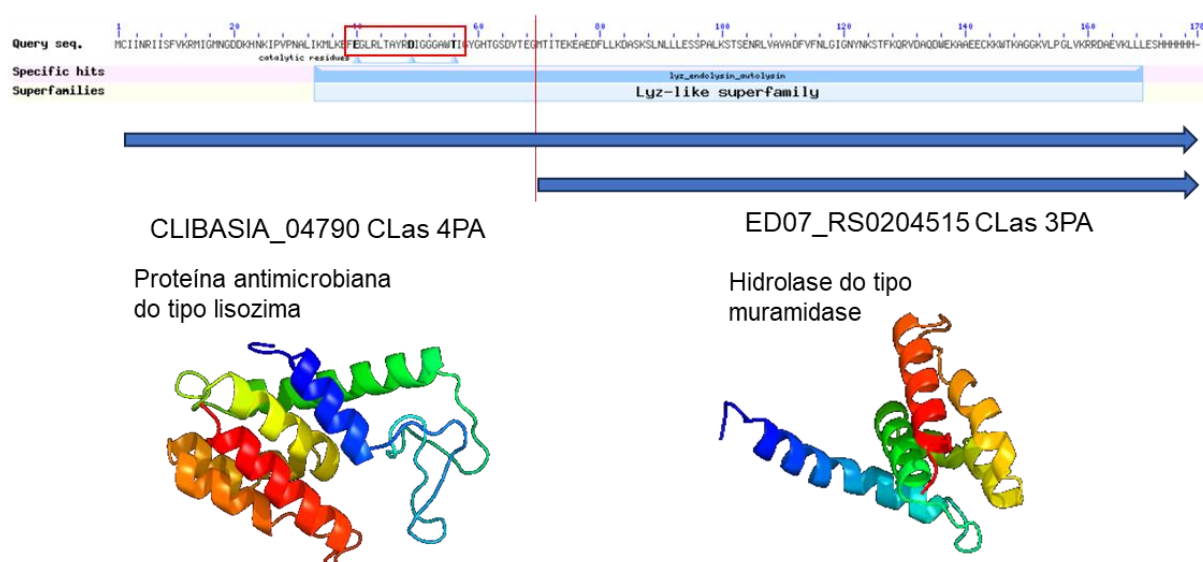
Figura 17. Alinhamento de resíduos **(A)** e predição de estrutura terciária **(B)** das lisozimas CLIBASIA_04790 e ED07_RS0204515.

(A)

CLIBASIA_04790	MCIINRIISFVKRMIGMNGDDKHNIKIPVPNALIKMLKEFEGRLRTAYRDIGGGAWTIGYG	60
ED07_RS0204515	-----	0
CLIBASIA_04790	HTGSDVTEGMITTEKEAEDFLDKASKSLNLLLESSPALKSTSENRLVAVADFVFNLGIG	120
ED07_RS0204515	-----MEMTITEKEAEDFLDKASKSLNLLLESSPALKSTSENRLVAVADFVFNLGIG	53

CLIBASIA_04790	NYNKSTFKQRVDAQDWEKAAEECKKWKAGGKVLPGLVKRRDAEVKLLLESHHHHHH	177
ED07_RS0204515	NYNKSTFKQRVDAQDWEKAAEECKKWKAGGKVLPGLVKRRDAEVKLLLESHHHHHH	110

(B)



Em (B) o retângulo vermelho indica a região onde estão presentes 3 resíduos catalíticos (E, D e T). A linha vermelha vertical indica onde os resíduos de ED07_RS0204515 começam.

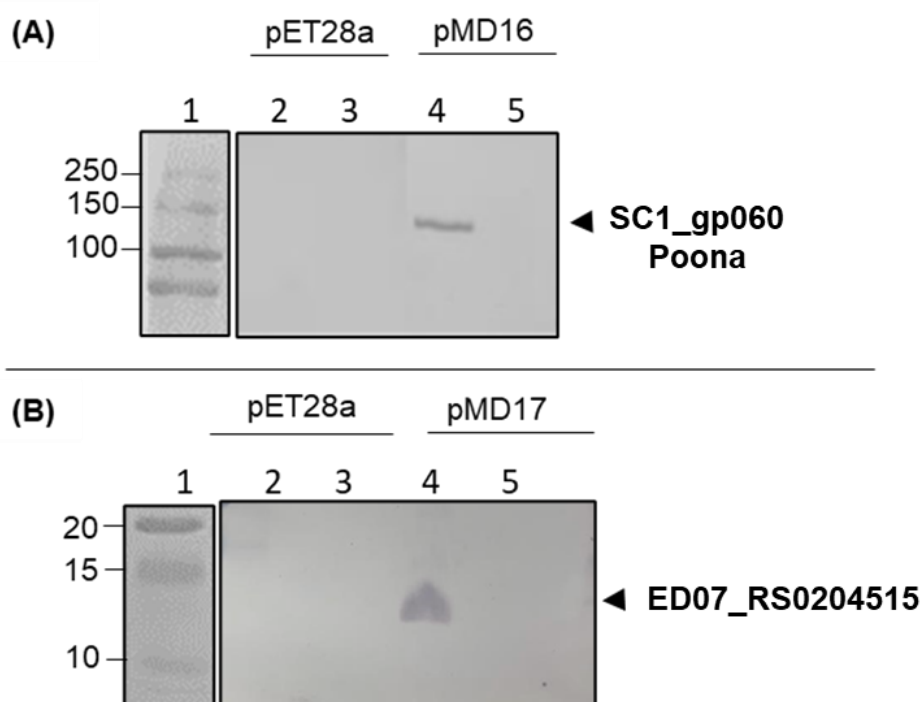
Fonte: a autora

4.5 Ensaio de secreção de SC1_gp060 e ED07_RS0204515 em *Escherichia coli*

Análises para predição de peptídeo sinal realizadas anteriormente para as proteínas estudadas (DUTRA, 2018) constataram a presença de peptídeo sinal para secreção extracelular bacteriana nas colicinas SC1_gp060 Poona, SC1_gp060 2PA e lam_678. No entanto, não foi observada a presença de peptídeo sinal em ED07_RS0204515 e CLIBASIA_04790. No presente trabalho ao utilizar a ferramenta de análise *in silico* SecretomeP 2.0, observou-se que as lisozimas ED07_RS0204515

e CLIBASIA_04790 não apresentam sinal de secreção 'não-clássico', com valores de SecP score de 0,3644 e 0,074, respectivamente. Este valor está abaixo do limite de corte de 0,5. Quando induzidas em células de *E. coli* BL21, ED07_RS0204515 não foi secretada, assim como esperado, permanecendo no interior das células (Figura 18). Por outro lado, SC1_gp060 Poona, também permaneceu no interior da célula mesmo tendo apresentado sinal para secreção extracelular.

Figura 18. Western-Blot do precipitado de células (P) e sobrenadante (S) de cultura de células de *Escherichia coli* BL21 expressando SC1_gp060 Poona **(A)** e ED07_RS0204515 **(B)**.



Em (A) as canaletas 4 e 5 referem-se a P e S de pMD16 (SC1_gp060 2PA). Em (B) as canaletas 2 e 3 referem-se a P e S de pMD17 (ED07_RS0204515). As canaletas 1, 2 e 3 em (A) e (B) indicam respectivamente o marcador molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio Rad) e P e S de PET28a (vetor vazio). Utilizou-se anticorpo Anti-6x His tag. Os géis utilizados estavam na concentração de 8% (A) e 15% (B).

Fonte: a autora

5 DISCUSSÃO

Estudos envolvendo cepas bacterianas e patossistemas demonstraram que as bactérias podem se adaptar a ambientes competitivos, seja com outras espécies procariontes ou até mesmo com eucariontes (BRAUN et al., 2013). Para se sobressair, elas evoluem e desenvolvem estratégias, como a produção de bacteriocinas que inibem o crescimento ou afetam diretamente células concorrentes, como acontece em cepas de *E. coli* produtoras de colicinas, em cepas de *Enterococcus faecalis* produtoras de Bacteriocina-21 e em cepas de *Pseudomonas chlororaphis* que secretam R-tailocinas (KERR et al., 2002; KOMMINENI et al., 2015; DOROSKY et al., 2017). Frequentemente, ao longo da evolução, essas bacteriocinas e outros genes antimicrobianos, como as lisozimas, podem ser adquiridas por meio da incorporação de profagos (NANDA et al., 2015). Tal fato é observado no genoma de bactérias fitopatogênicas como *Candidatus Liberibacter*, *Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas oryzae*, nas quais regiões de profagos contendo genes de lise foram identificados (AHERN, et al., 2014; LEE et al., 2006; ZHANG et al., 2011). Ainda, mosaicos de sequências variáveis (do inglês Sequence-Variable Mosaics) que provêm de profagos também são encontrados em bactérias do tipo fitoplasma, como por exemplo em *Candidatus Phytoplasma asteris* (WEI et al., 2008).

No presente estudo, foi investigado o impacto da expressão das bacteriocinas SC1_gp060 2PA, SC1_gp060 Poona e lam_678, todas localizadas na região do profago de suas respectivas estirpes CLas e CLam, no crescimento das células de *E. coli* BL21. Adicionalmente as lisozimas ED07_RS0204515 e CLIBASIA_04790 também foram analisadas e embora estejam localizadas na região cromossomal, elas possuem homologia a genes de profagos. A indução da expressão das proteínas recombinantes SC1_gp060 Poona, ED07_RS0204515 e CLIBASIA_04790 em meio líquido ou sólido, resultou em significativa estagnação no crescimento de *E. coli*. Este resultado é consistente com a anotação destas proteínas: colicinas são bacteriocinas codificadas por plasmídeos ou profagos, com efeito citotóxico em células bacterianas e lisozimas são enzimas capazes de lisar as células de diversas espécies bacterianas (FLEITES et al., 2014; FLEMING, 1922; KIENKER et al., 1997; KIM et al., 2014; WITTMANN et al., 2016). No que diz respeito aos efeitos antibacterianos em células de *E. coli*, notamos resultados semelhantes aos encontrados no estudo feito por FLEITES et al. (2014) com a lisozima CLIBASIA_04790 quando expressa sob

condições semelhantes. Além disso, o estudo conduzido por XU et al. (2023) incluiu uma análise em meio sólido usando as lisozimas CLIBASIA_04790 e CLIBASIA_04800 purificadas e revelou que essas proteínas também demonstram efeitos inibitórios contra cepas de *Agrobacterium tumefaciens*. Neste trabalho, tanto ED07_RS0204515 3PA quanto SC1_gp060 Poona apresentaram comportamento semelhante, levando a estagnação do crescimento das células produtoras. A diferença de crescimento em comparação com os controles foi de 73% e 70%, respectivamente. A conclusão dos resultados sugere que os dois genes em questão, ao produzirem proteínas com atividade biológica, desempenham um papel relevante na biologia dos profagos e da Liberibacter. Tal importância é refletida na capacidade de restringir a diversidade de hospedeiros de CLas e influenciar sua viabilidade em culturas, conforme indicado por FLEITES et al. (2014). Os autores destacam que, em interação com fatores presentes em extratos brutos de plantas rutáceas e psilídeos, os promotores de holina e endolisina têm sua função suprimida, permitindo que a Liberibacter se desenvolva. Adicionalmente, as lisozimas desempenham um papel crucial durante o processo de aumento e divisão da parede celular em bactérias gram-negativas, realizando a clivagem controlada das ligações dos ácidos N-acetilmurâmico e N-acetilglicosamina que compõem o peptidoglicano (HÖLTJE, 1996). Ainda, essas proteínas podem ser consideradas como promissoras para a modificação genética de plantas, devido à sua eficiência em inibir o crescimento bacteriano, como constatado em células de *E. coli* BL21 no presente trabalho. Especialmente ED07_RS0204515 se destaca, devido ao seu tamanho reduzido e maior eficácia, cerca de 50% mais efetivo quando comparado a CLIBASIA_04790. Em contrapartida SC1_gp060 2PA e lam_678 não mostraram efeito antibacteriano às células produtoras ao serem expressas. Possivelmente SC1_gp060 2PA sofre clivagem pela ação de serina-proteases. Além da identificação de uma proteína de tamanho menor ao esperado por Western-blot (correspondente ao fragmento C-terminal que possui a 6x His tag), pode-se inferir tal suposição por uma inserção de 8 resíduos de aminoácidos presentes em SC1_gp060 2PA, mas não em SC1_gp060 Poona. Tais resíduos se mostraram ser um sítio de proteólise. A superexpressão de proteínas recombinantes pode levar ao estresse celular, o que desencadeia atividade proteolítica (RAMIRÉZ; BENTLEY, 1999). A proteólise possivelmente divide SC1_gp060 2PA em duas partes, separando o fragmento C-terminal que contém o domínio de toxina (Toxin A) do fragmento N-terminal, que é responsável pela translocação através da membrana celular (TolA

box). Isso pode resultar na perda da capacidade da proteína em exercer sua ação antibacteriana. Além do possível sítio de proteólise, outra diferença significativa entre essas proteínas é uma inserção de 8 resíduos de aminoácidos (EAQEKA EK) em SC1_gp060 Poona quando comparada com SC1_gp060 2PA. A presença destes 8 resíduos pode ser crucial para a letalidade desta proteína. Um estudo conduzido por DA SILVA et al. (2017) mostrou que a adição de quatro dos oito resíduos divergentes, KAEK, ao peptídeo KR-12 aumentou significativamente sua ação antimicrobiana. Esses resíduos aumentaram a anfipatia e a carga do peptídeo fazendo com que ele fosse mais ativo. Essas propriedades estão diretamente relacionadas a habilidades de peptídeos ou proteínas de se ligarem à membrana de bactérias e formar poros (CESPEDES et al., 2012; CHEN et al., 2005; DA SILVA et al., 2017). Tais fatores isolados ou combinados podem ser os responsáveis pelo efeito de SC1_gp060 Poona e não de SC1_gp060 2PA observado em células de *E. coli*. A proteína recombinante lam_678 também mostra tamanho reduzido nas análises de Western-blot, indicando que, possivelmente, um mecanismo de clivagem semelhante ocorra. Por outro lado, predições de domínio conservado e estrutura terciária, mostram que lam_678 pode estar relacionada a funções de manutenção celular, não possuindo atividade citotóxica. Ao serem analisadas quanto a presença ou não de peptídeo sinal SC1_gp060 2PA e SC1_gp060 Poona demonstraram possuir sistema clássico de secreção extracelular, enquanto que o mesmo não foi observado para lam_678, ED07_RS0204515 e CLIBASIA_04790. Estas últimas também não possuem sinal de secreção não clássico. SC1_gp060 Poona e ED07_RS0204515 foram expressas e identificadas no interior das células de *E. coli*. Muitas toxinas bacterianas são produzidas e deixam a célula através de sistemas de secreção altamente especializados clássicos e não clássicos, que abrangem a membrana bacteriana (JONES et al., 2021). Ao serem produzidas por bactérias, bacteriocinas podem se acumular no citoplasma ou periplasma e posteriormente deixar a célula produtora. Este mecanismo se dá de duas formas: através de um sistema onde uma proteína produzida, chamada de proteína de lise da colicina, media sua liberação e também através de proteínas transportadoras (CASCALES et al., 2020). No caso de ED07_RS0204515 ou CLIBASIA_04790, não é esperado que sejam secretadas, visto que não foi encontrado sinal de secreção nessas proteínas e ainda, lisozimas são utilizadas por fagos para lise bacteriana no momento da ativação do ciclo lítico e também por bactérias em processos como síntese de parede celular e

remodelamento, com ação no interior da célula (DUCKWORTH, 1969; FASTREZ, 1996; HÖLTJE, 1996; REN et al., 2017). Por outro lado, não era esperado que as bacteriocinas SC1_gp060 2PA e Poona fossem encontradas no extrato do sobrenadante ao serem produzidas por *E. coli*. JAIN et al. (2015) ao estudarem uma peroxidase codificada pelo profago SC2 de CLas verificaram que quando era produzida por células de *E. coli* esta proteína não era secretada, enquanto que a mesma foi detectada no extrato do sobrenadante do cultivo celular quando produzida por células de Lcr. Similarmente uma peroxiredoxina de CLas foi secretada somente ao ser expressa em células de Lcr (SINGH et al., 2016; JAIN et al., 2018). Tais evidências levam a suposição de que a secreção extracelular dessas proteínas é dependente de um sistema de secreção espécie-específico ou espécie-limitado (JAIN et al., 2015).

A indução da expressão das proteínas recombinantes neste estudo, aliada a outras análises como western-blot para identificação da proteína produzida e seu tamanho, bem como da sua secreção, além de comparações de sequência, identificação de possíveis sítios de proteólise, identificação de domínios conservados e análise da estrutura terciária, revelaram algumas características distintas dessas proteínas. No caso de SC1_gp060 Poona e SC1_gp060 2PA, a primeira tem efeito antibacteriano quando expressa em células de *E. coli* e a segunda não. O principal fato é que ambas possuem sutis diferenças nos resíduos que são essenciais para a funcionalidade de ambas e que podem resultar na inatividade da sua função. No caso de lam_678 algo semelhante pode ocorrer. Em ED07_RS0204515 a falta de uma porção N-terminal de 67 resíduos quando comparadas a CLIBASIA_04790 ocasiona uma melhora significativa na sua função antibacteriana chegando a ser quase 50% mais efetiva contra células de *E. coli* produtoras. A possibilidade de utilizar essas proteínas contra bactérias causadoras do HLB pode ser uma estratégia promissora para auxiliar na proteção das plantações de citros e, assim, contribuir para o avanço da citricultura. Portanto, a pesquisa aqui discutida tem o potencial de impulsionar a busca por soluções no combate a essa doença que afeta uma das indústrias agrícolas mais importantes do mundo.

6 CONCLUSÕES

- Neste trabalho, a avaliação da cinética de crescimento da *E. coli* BL21 expressando a bacteriocina SC1_gp060 Poona assim como também as lisozimas CLIBASIA_04790 e ED07_RS0204515, confirmou a função antimicrobiana dessas proteínas;
- SC1_gp060 2PA e possivelmente lam_678 sofrem clivagem por proteases; e isso pode explicar a inatividade destas proteínas;
- SC1_gp060 2PA e SC1_gp060 Poona possuem um domínio conservado TolA, que pode estar ligado a translocação para o interior das células;
- SC1_gp060 Poona e ED07_RS0204515 foram detectadas somente no precipitado de células (pelete bacteriano), apesar de a primeira ter sinal de secreção;
- SC1_gp060 e ED07_RS0204515 são potenciais genes a serem utilizados em expressão ectópica em laranjeiras geneticamente modificadas para combater bactérias que causam o HLB.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHERN, S. J.; DAS, M.; BHOWMICK, T. S.; YOUNG, R.; GONZALEZ, C. F. Characterization of novel virulent broad-host-range phages of *Xylella fastidiosa* and *Xanthomonas*. *Jornal de Bacteriologia*, [S.l.], v. 196, n. 2, p. 459-471, jan. 2014. DOI: 10.1128/JB.01080-13.
- ALQUÉZAR, B.; CARMONA, L.; BENNICI, S.; PEÑA, L. Engineering citrus to obtain huanglongbing resistance. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 7, p. 196-203, 2021
- ALQUÉZAR, B.; CARMONA, L.; BENNICI, S.; MIRANDA, M. P.; BASSANEZI, R. B.; PEÑA, L. Cultural Management of Huanglongbing: Current Status and Ongoing Research. *Phytopathology*, v. 112, n. 1, p. 11-25, 2022.
- ALVES, M. N.; LOPES, S. A.; RAIOL-JUNIOR, L. L.; WULFF, N. A.; GIRARDI, E. A.; OLLITRAULT, P.; PEÑA, L. Resistance to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*,' the Huanglongbing Associated Bacterium, in Sexually and/or Graft-Compatible Citrus Relatives. *Frontiers in Plant Science*, v. 11, p. 617-664, 2021.
- ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI, Jr. W.; VAN ELSAS, J. D.; VAN VUURDE, J. W.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, p. 4906-4914, 2002.
- BASSANEZI, R. B.; LOPES, S. A.; DE MIRANDA, M. P.; WULFF, N. A.; VOLPE, H. X. L.; AYRES, A. J. Overview of citrus huanglongbing spread and management strategies in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, v. 45, n. 3, p. 251-264, 2020.
- BELASQUE-JUNIOR, J.; BERGAMIM-FILHO, A.; BASSANEZI, R. B.; BARBOSA, J. C.; FERNANDES, N. G.; YAMAMOTO, P. T.; LOPES, S. A.; MACHADO, M. A.; LEITE-JUNIOR, R. P.; AYRES, A. J.; MASSARI, C. A. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. *Tropical Plant Pathology*, v. 34, n. 3, p. 137-145, 2009.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, n. 72, p. 248-54, 1976.
- BRAUN, V.; PATZER, S. I. Intercellular communication by related bacterial protein toxins: colicins, contact-dependent inhibitors, and proteins exported by the type VI secretion system. *FEMS Microbiology Letters*, v. 345, n. 1, p. 13–21, 2013.
- DUTRA, M. F. S. Análise funcional de genes de *Candidatus Liberibacter asiaticus*, bactéria associada ao huanglongbing dos citros. 2018. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, 122 f.

- FLEITES, L.; JAIN, M.; ZHANG, S.; GABRIEL, D. W. "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" prophage late genes may limit host range and culturability. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 80, n. 19, p. 6023-6030, 2014.
- FLEMING, A. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc. Roy. Soc. B.*, v. 93, n. 653, 1922.
- GOTTWALD, T. R. Current Epidemiological Understanding of Citrus Huanglongbing. *Annu. Rev. Phytopathol.*, v. 48, p. 119-139, 2010.
- GUIDOLIN, A. S.; CÔNSOLI, F. L. Molecular characterization of *Wolbachia* strains associated with the invasive Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* in Brazil. **Microbial Ecology**, v. 65, p. 475–486, 2013. DOI: 10.1007/s00248-012-0150-7.
- HIBBING, M. E.; FUQUA, C.; PARSEK, M. R.; PETERSON, S. B. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol.*, v. 1, p. 15-25, 2010.
- HÖLTJE, J. V. Bacterial lysozymes. *EXS*, [S.l.], v. 75, p. 65-74, 1996. DOI: 10.1007/978-3-0348-9225-4_4.
- HUANG, C.; ARAUJO, C.; SÁNCHEZ, J. N.; KUND, G.; TRUMBLE, J.; ROPER, C.; GODFREY, K. E.; JIN, H. A stable antimicrobial peptide with dual functions of treating and preventing citrus Huanglongbing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 118, n. 6, 2021.
- JAIN, M.; FLEITES, L. A.; GABRIEL, D. W. Prophage-encoded peroxidase in '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' is a secreted effector that suppresses plant defenses. *Mol. Plant Microbe Interact.*, v. 28, n. 12, p. 1330-1337, 2015.
- JAIN, M.; MUNOZ-BODNAR, A.; ZHANG, S.; GABRIEL, D. W. A secreted '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' peroxiredoxin simultaneously suppresses both localized and systemic innate immune responses in planta. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, v. 31, p. 1312-1322, 2018.
- JONES, A. M.; VIRTANEN, P.; HAMMARLÖF, D.; ALLEN, W. J.; COLLINSON, I.; HAYES, C. S.; LOW, D. A.; KOSKINIEMI, S. Genetic Evidence for SecY Translocon-Mediated Import of Two Contact-Dependent Growth Inhibition (CDI) Toxins. *ASM Journals*, v. 12, n. 1, 2021.
- KERR, B.; RILEY, M. A.; FELDMAN, M. W.; BOHANNAN, J. M. Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock–paper–scissors. *Nature*, v. 418, p. 171-174, 2002.
- KIENKER, P. K.; QIU, X. Q.; SLATIN, S. L.; FINKELSTEIN, A.; JAKES, K. S. Transmembrane insertion of the Colicin Ia hydrophobic hairpin. *J. Membrane Biology*, v. 157, n. 1, p. 27-37, 1997.

- KIM, W.; SALM, H.; GEIDER, K. Expression of bacteriophage wEa1h lysozyme in *Escherichia coli* and its activity in growth inhibition of *Erwinia amylovora*. *Microbiology*, v. 150, p. 2707–2714, 2004.
- KOMMINENI, S.; BRET, L. D. J.; LAM, V.; CHAKRABORTY, R.; HAYWARD, M.; SIMPSON, P.; CAO, H.; BOUSOUNIS, P.; KRISTICH, C. J.; SALZMAN, N. H. Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian gastrointestinal tract. *Nature*, v. 526, p. 719-722, 2015.
- LOPES, A. S.; 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. *Phytopathol.*, v. 99, p. 301-306, 2009.
- LEE, C. N.; LIN, J. W.; CHOW, T. Y.; TSENG, Y. H.; WENG, S. F. A novel lysozyme from *Xanthomonas oryzae* phage varphiXo411 active against *Xanthomonas* and *Stenotrophomonas*. *Protein Expression and Purification*, [S.l.], v. 50, n. 2, p. 229-237, dez. 2006. DOI: 10.1016/j.pep.2006.06.013
- PEÑA, L.; CERVERA, M.; FAGOAGA, C.; ROMERO, J.; BALLESTER, A.; SOLER, N.; PONS, E.; RODRIGUEZ, A.; PERIS, J.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, L. Citrus. In: KOLE, C.; HALL, T. C. (Org.) *Compendium of transgenic crop plants: transgenic tropical and subtropical fruits and nuts*. Oxford; Wiley-Blackwell, 2008. v. 5, p. 1-62.
- RAMIREZ, D. M.; BENTLEY, W. E. Characterization of stress and protein turnover from protein overexpression in fed-batch *E. coli* cultures. *Journal of biotechnology*, v. 71, n. 1-3, p. 39-58, 1999.
- REN, Q.; WANG, C.; JIN, M.; LAN, J.; YE, T.; HUI, K.; TAN, J.; WANG, Z.; WYCKOFF, G. J.; WANG, W.; HAN, G. Co-option of bacteriophage lysozyme genes by bivalve genomes. *Open Biol.*, v. 7, n. 1, 2017.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
- SUBANDIYAH, S.; NIKOH, N.; TSUYUMU, S.; SOMOWIYARJO, S.; FUKATSU, T. Complex endosymbiotic microbiota of the citrus psyllid *Diaphorina citri* (Homoptera: Psylloidea). **Zoological Science**, v. 17, p. 983–989, 2000. DOI: 10.2108/zsj.17.983.
- SINGH, A.; KUMAR, N.; TOMAR, P. P.; BOSE, S.; GHOSH, D. K.; ROY, P.; SHARMA, A. K. Characterization of a bacterioferritin comigratory protein family 1-Cys peroxiredoxin from *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Protoplasma*, v. 254, p. 1675-1691, 2017.

- WEI, W.; DAVIS, R. E.; JOMANTIENE, R.; ZHAO, Y. Ancient, recurrent phage attacks and recombination shaped dynamic sequence-variable mosaics at the root of phytoplasma genome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 33, p. 11827-11832, 19 ago. 2008. DOI: 10.1073/pnas.0805237105.
- XU, L.; MO, K.; RAN, D.; MA, J.; ZHANG, L.; SUN, Y.; LONG, Q.; JIANG, G.; ZHAO, X.; ZOU, X. An endolysin gene from *Candidatus Liberibacter asiaticus* confers dual resistance to huanglongbing and citrus canker. *HORTICULTURE RESEARCH*, v. 10, n. 9, p. UHAD159, 2023. DOI: 10.1093/hr/uhad159.
- ZHANG, S.; FLORES-CRUZ, Z.; ZHOU, L.; KANG, B. H.; FLEITES, L. A.; GOOCH, M. D.; WULFF, N. A.; DAVIS, M. J.; DUAN, Y. P.; GABRIEL, D. W. *Ca. Liberibacter asiaticus*' carries an excision plasmid prophage and a chromosomally integrated prophage that becomes lytic in plant infections. *Mol Plant Microbe Interact.*, v. 24, n. 4, p. 458-468, 2011.

CAPÍTULO 3

BACTERIOCINAS E LISOZIMA COMO POTENCIAIS AGENTES DE CONTROLE DE LIBERIBACTÉRIAS EM LARANJEIRAS-DOCES MEDIANTE EXPRESSÃO ECTÓPICA

RESUMO

Todas as variedades comerciais de citros são suscetíveis ao Huanglongbing (HLB), uma doença emergente para a qual ainda não existe cura. Nesse contexto, o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas (GM) apresentando resistência a bactéria ou ao inseto vetor, representa um caminho para a sustentabilidade da citricultura. Anteriormente, constatamos que a bacteriocina SC1_gp060 e a lisozima ED07_RS020515 demonstraram efeito inibitório sob o crescimento de *Escherichia coli*, destacando-as como potenciais para serem utilizadas no melhoramento genético de plantas. Neste estudo, obtivemos laranjeiras-doces expressando as bacteriocinas SC1_gp060 e lam_678, além da lisozima ED07_RS0204515 através de transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*. Para dirigir a expressão destes genes utilizamos os promotores 35S CaMV e AtSUC2, este último conferindo expressão direcionada ao floema. As plantas foram caracterizadas genotipicamente e fenotipicamente e propagadas e desafiadas contra '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (CLas) e '*Ca. Liberibacter americanus*' (CLam). Os resultados aos 360 dias após a inoculação (DAI) para os desafios contra CLas e CLam em laranjeiras expressando SC1_gp060 não revelaram diferenças estatísticas nos títulos e nas porcentagens de plantas positivas em relação aos controles. Da mesma forma, a expressão de ED07_RS0204515 no floema de laranjeiras doces não se mostrou efetiva no controle da multiplicação de CLas no sistema utilizado. Por outro lado, o promotor AtSUC2 demonstrou incrementar a expressão de SC1_gp060 na presença de CLas. Esses resultados ressaltam a complexidade da interação planta-patógeno, destacando a necessidade contínua de aprimorar estratégias de engenharia genética visando à resistência efetiva contra o HLB.

Palavras-chave: Citrus geneticamente modificados, promotores floema-restritos, expressão gênica, *Candidatus Liberibacter*, bacteriocinas, lisozimas

BACTERIOCINS AND LYSOZYME AS POTENTIAL CONTROL AGENTS OF LIBERIBACTER IN SWEET ORANGES BY ECTOPIC EXPRESSION

ABSTRACT

All commercial citrus varieties are susceptible to Huanglongbing (HLB), an emerging disease for which there is currently no cure. In this context, the development of genetically modified (GM) plants exhibiting resistance to the bacterium or its vector insect represents a pathway toward sustainability in citrus cultivation. Previously, we observed that the bacteriocin SC1_gp060 and lysozyme ED07_RS020515 demonstrated inhibitory effects on the growth of *Escherichia coli*, showcasing their potential for use in plant genetic improvement. In this study, we obtained sweet orange trees expressing the bacteriocins SC1_gp060 and lam_678, along with lysozyme ED07_RS0204515, through genetic transformation via *Agrobacterium tumefaciens*. To direct the expression of these genes, we employed the 35S CaMV and AtSUC2 promoters, with the latter conferring phloem-targeted expression. The plants were characterized genotypically and phenotypically, propagated, and challenged against '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' (CLas) and '*Ca. Liberibacter americanus*' (CLam). Results at 360 days after inoculation (DAI) for challenges against CLas and CLam in orange trees expressing SC1_gp060 did not reveal statistical differences in titers and percentages of positive plants compared to controls. Similarly, the expression of ED07_RS0204515 in the phloem of sweet orange trees was not effective in controlling the multiplication of CLas in the system used. On the other hand, the AtSUC2 promoter demonstrated an increase in the expression of SC1_gp060 in the presence of CLas. These results underscore the complexity of the plant-pathogen interaction, emphasizing the ongoing need to enhance genetic engineering strategies for effective resistance against HLB.

Keywords: Genetically modified citrus, phloem-restricted promoters, gene expression, *Candidatus* Liberibacter, bacteriocins, lysozymes.

1 INTRODUÇÃO

Os citros pertencem a família *Rutaceae* e desempenham um papel fundamental na economia global, sendo extensivamente cultivados. Representam fonte de macro e micro nutrientes, são ricos em vitamina C e antioxidantes e além disso possuem propriedades anti-inflamatórias (LIU et al., 2012; MA et al., 2020). No Brasil a produção de laranjas-doces é notavelmente expressiva, atribuindo ao país o título de maior produtor global dessa fruta. Além disso, em termos comerciais, o Brasil exerce uma influência marcante, detendo uma significativa fatia de 75% do mercado global de suco de laranja (USDA/FAS, 2023), com importante papel social. Contudo, a citricultura enfrenta desafios que impactam negativamente a qualidade e produtividade das plantações, sendo o Huanglongbing uma ameaça constante aos pomares e à indústria citrícola (BASSANEZI et al., 2020, BOVÉ, 2006). Para enfrentar esses desafios, o melhoramento genético desempenha um papel crucial, já que não existem variedades comerciais de citros resistentes ao HLB.

Parentes distante de citros, distintos da laranja-doce, tais quais *Poncirus trifoliata*, *Eremocitrus glauca* e algumas espécies de *Microcitrus* foram designadas como resistentes e/ou tolerantes ao HLB (ALVES et al., 2020; FOLIMONOVA et al., 2009), mas sua introgressão em laranjas é um desafio não somente em termos de efetividade da resposta à doença, como são os casos do citrumelo Swingle (*Poncirus trifoliata* x *Citrus paradisi*) e citrange (*Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis*) ambos suscetíveis, mas também em termos de qualidade da fruta. Ainda, as variedades de citros enfrentam limitações biológicas que dificultam o melhoramento por métodos convencionais. Dentre essas limitações pode-se citar longo período de juvenilidade, incompatibilidade, poliembrionia, heterozigosidade e partenocarpia (ALVES et al., 2020; SUN et al., 2019). Mesmo com o surgimento de novas técnicas de biologia molecular e genética, tais quais marcadores moleculares, mapeamento genético e sequenciamento, as limitações permanecem. Como resultado, pesquisas sobre a obtenção de citros geneticamente modificados, seja por transformação ou edição gênica, têm sido desenvolvidas nos últimos anos (ALQUÉZAR et al., 2021; DUTT et al., 2015; JIA et al., 2017a; JIA et al., 2017b; MIYATA et al. 2017; ZOU et al. 2017; TAVANO et al. 2019; XU et al., 2023).

Um Organismo Geneticamente Modificado (GM), é aquele cujo material genético, DNA ou RNA, tenha sido modificado por qualquer técnica de engenharia

genética (BRASIL, 2005). A agricultura tem sido pioneira na adoção de modificações genéticas (KISHOR et al., 2021) e o Brasil tem se destacado como um dos principais investidores nesse campo sendo o segundo país com maior produção de cultivares transgênicos (USDA, 2022). Tal fato demonstra o compromisso com práticas agrícolas mais eficientes e ambientalmente responsáveis.

A obtenção de citros GM via transformação genética representa uma ferramenta importante para o atual cenário da citricultura (SUN et al., 2019; ALQUÉZAR et al., 2021). A edição genética, notavelmente com técnicas como CRISPR/Cas9, oferece uma precisão excepcional ao modificar genes específicos nos citros, destacando-se pela possibilidade de introdução de características benéficas (JIA et al., 2017a). Contudo, essa técnica enfrenta desafios, como a limitação no tamanho de inserções de sequências de DNA e a possível ocorrência de efeitos fora do alvo (SUN et al., 2019). Por outro lado, a transformação genética, uma abordagem mais tradicional na citricultura, permite a inserção de genes inteiros, possibilitando modificações complexas. Apesar de apresentar menos precisão em comparação à edição genética, a transformação possuiu uma base técnica mais estabelecida e tem sido aplicada por mais tempo (SUN et al., 2019).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi gerar plantas GM que expressem genes cujos produtos sejam letais ou diminuam a quantidade ou o *fitness* das bactérias causadoras do Huanglongbing. Para isso, os genes SC1_gp060 2PA, lam_678 e ED07_RS0204515 foram clonados em vetores binários e introduzidos nas variedades de laranjeiras-doces 'Valencia' e 'Pera' por meio da transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

2 OBJETIVOS

3.6 Objetivo geral

Avaliar o efeito da expressão de bacteriocinas e lisozimas em laranjeiras-doces desafiadas contra CLas e CLam.

3.7 Objetivos específicos

- I) Obter laranjeiras-doces geneticamente modificadas (GM) transformadas via *Agrobacterium tumefaciens*, expressando as bacteriocinas SC1_gp060 e lam_678, juntamente com a lisozima ED07_RS0204515;
- II) Caracterizar genotipicamente e fenotipicamente as plantas GM produzidas;
- III) Quantificar a expressão de SC1_gp060, lam_678 e ED07_RS0204515 nas plantas produzidas;
- IV) Inocular as plantas GM com CLas e CLam e avaliar os títulos bacterianos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados utilizando organismos GM, incluindo bactérias e plantas, foram conduzidos exclusivamente em ambientes credenciados com o Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) concedido pela CTNBio, nas dependências do Fundecitrus em Araraquara, São Paulo, Brasil. Estes ambientes incluem laboratórios e casas de vegetação e destacam o comprometimento com as normas e padrões de segurança em todos os aspectos relacionados à manipulação de GM.

3.1 Obtenção do cassete de expressão de ED07_RS0204515 em sistema *Golden Braid*

Para a avaliação da atividade antibacteriana de SC1_gp060, lam_678 e ED07_RS0204515 expressas em laranjeiras-doces frente a CLas e CLam, foram testadas três construções. As construções contendo as colicinas SC1_gp060 e lam_678, nomeadas PAS2 e PAS3, respectivamente, foram obtidas durante o projeto de pós-doutoramento da Dra. Priscila Alves da Silva desenvolvido no Fundecitrus com apoio financeiro da Fapesp (Processo 2016/01993-1) (dados não publicados) e a construção contendo a lisozima ED07_RS0204515, nomeada MD26, foi obtida no presente trabalho.

Os cassetes foram montados utilizando-se o *Golden Braid* 3.0 (<https://gbcloning.upv.es/>) que é uma técnica de clonagem molecular utilizada em biologia sintética e engenharia genética. Essa técnica permite a montagem rápida e eficiente de construções complexas, como plasmídeos, através da combinação de fragmentos de DNA usando enzimas de clivagem e ligases. Através da ferramenta 'GB Domesticator' define-se os 'blocos' da construção, que são sequências de DNA tais como promotor, terminador e gene de seleção. Esses blocos são domesticados, dando origem a módulos gênicos básicos. Entende-se como domesticação a clonagem de um bloco no vetor pUPD2. Posteriormente, os módulos gênicos são submetidos a reações simultâneas de clivagem enzimática e ligação passando por vetores intermediários e formando as unidades transcricionais. Entende-se como unidade transcricional uma sequência de DNA contendo um gene e suas regiões de controle associadas como promotor e terminador. Ao final duas unidades

transcrpcionais podem ser unidas para gerar a construção final em um plasmídeo binário. Os vetores e módulos gênicos fornecidos pela Universidade Politécnica de Valência - UPV (Valência, Espanha), assim como também os módulos e unidades transcrpcionais obtidos neste trabalho, estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Descrição de vetores e módulos gênicos *Golden Braid*

Vetores/ módulos gênicos/ Unidades transcrpcionais	Características	Marca de resistência	Referência
pUPD2	Vetor de domesticação	cloranfenicol	UPV
pDGB3α2	Vetor intermediário	canamicina	UPV
pDGB3Ω1	Vetor binário final	espectinomicina	UPV
GB0030	P-35S em pUPD2	clorafenicol	UPV
GB0037	T-NOS em pUPD2	clorafenicol	UPV
GB_UD_73A9	ED07_RS0204515 em pUPD2	cloranfenicol	Este trabalho
GB_UD_27D8	P-AtSUC2 em pUPD2	clorafenicol	Fundecitrus*
GB_UA_4357	Unidade transcrpcional P-AtSUC2:ED07_RS0204515:T- NOS em pDGB3α2	canamicina	Este trabalho
GB0226	unidade transcrpcional T-NOS: <i>nptII</i> :P-NOS em pDGB3α2	canamicina	UPV

*Projeto de pós doutoramento da Dra. Priscila Alves da Silva, FAPESP Processo 2016/01993-1 - Fundecitrus).

Fonte: a autora

Foram selecionados os promotores P-35S do Vírus do Mosaico da Couve-flor CaMV), amplamente utilizado para expressão gênica em plantas, e o P-AtSUC2, do transportador de sucrose de *Arabidopsis thaliana*. Este último promotor tem sido utilizado em estudos envolvendo citros devido à sua característica em direcionar a expressão gênica para o floema (SINGER et al., 2011; DUTT et al., 2012; MIYATA et al., 2012). Para a marca de seleção foi utilizado o cassete de *nptII*, com o gene da neomicina fosfotransferase II sob o controle das sequências promotora (P-NOS) e terminadora (T-NOS) do gene da nopalina sintase de *A. tumefaciens*. Os detalhes das construções finais estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Descrição das construções *Golden Braid*

Construção	Características	Marca de resistência	Referência
PAS2	T-NOS: <i>nptII</i> :P-NOS:P- <i>AtSUC2</i> :SC1_gp060_GB: T-NOS em pDGB3Ω1	Espectinomicina	Fundecitrus
PAS3	T-NOS: <i>nptII</i> :P-NOS:P-35S: <i>lam_678_GB</i> :T- NOS em pDGB3Ω1	Espectinomicina	Fundecitrus
MD26	T-NOS: <i>nptII</i> :P-NOS:P- <i>AtSUC2</i> :ED07_RS0204515:T-NOS em pDGB3Ω1	Espectinomicina	Este Trabalho

Fonte: a autora

3.1.1 Otimização de códons e síntese de ED07_RS0204515

Para a expressão eficiente dos genes de interesse, que são de origem procarionte, em eucariontes superiores como a laranjeira-doce, fez-se necessária a otimização de códons. Para tal, utilizou-se a ferramenta de bioinformática *Optimizer* (<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/>). Fez-se também a verificação da presença de sítios para as enzimas de restrição *Bsal* e *Bsmbl* nas sequências dos genes com a ferramenta Clustal Ômega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Como as enzimas de restrição *Bsal* e *BsmBI* fazem parte do mecanismo de clonagem do sistema Golden Braid, a ausência de sítios para estas enzimas é um pré-requisito para a clonagem empregando este sistema. A sequência gerada pela ferramenta foi sintetizada e clonada no vetor pUC57 pela empresa GenScript (Piscataway, Nova Jersey, nos Estados Unidos).

3.1.2 Amplificação via PCR e domesticação de ED07_RS0204515 em pUPD2

O DNA fornecido pela GenScript clonado em pUC57 foi utilizado como DNA molde em reação de amplificação com os primers *Lis_GB_F* (CATAGAGCTCGCGCCGTCTCGCTCGAATGACAATTACAGAAAAGGAAG) e *Lis_GB_R* (CATAGAGCTCGCGCCGTCTCGCCAAAGCTCAGCTTTCAAGAAGAAG). Os primers possuem sítios para a enzima Golden Braid *BsmBI* (CGTCTC) e também sítio par *SacI* (GAGCTC), como indicado nas sequências acima (sublinhadas). O sítio para a enzima *SacI* foi adicionado como uma opção caso optássemos por outras estratégias de clonagem por clivagem. A PCR foi conduzida em termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific), nas seguintes condições: 98 °C

por 30 seg, seguidos de 35 ciclos de 98 °C por 20 segundos, 58 °C por 30 segundos e 72 °C por 2 minutos. A extensão final se deu a 72 °C por 10 minutos. Nas reações, os primers foram empregados em uma concentração final de 0,2 µM. A enzima utilizada foi a Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) seguindo as instruções do fabricante.

O fragmento obtido, foi purificado com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos), seguindo as recomendações do fabricante. A domesticação foi realizada em um termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) em 25 ciclos de 37 °C durante 2 minutos seguidos de 16 °C por 5 minutos. Em um volume total de 10 µL de reação foram utilizados 40 ng do fragmento ED07_RS0204515 purificado, 75 ng do vetor pUPD2, 10 unidades da enzima *Bsm*BI (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, Estados Unidos), 3 U da enzima T4 ligase (Promega) e 1X tampão da reação. Células de *Escherichia coli* JM109 (Promega) eletrocompetentes foram transformadas por eletroporação (SAMBROOK, FRITSH, MANIATIS, 2012) e a seleção de colônias transformantes foi feita em Lysogeny Broth (LB) sólido contendo cloranfenicol (25 µg/mL), isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (0,5 mM) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo (X-GAL) (40 µg/mL). A confirmação da clonagem foi realizada a partir da extração do DNA plasmidial das culturas de colônias selecionadas (SAMBROOK, FRITSH, MANIATIS, 2012). O DNA resultante foi submetido a clivagem enzimática com a enzima *Not*I (New England Biolabs) e os perfis foram verificados em gel de agarose 1% (m/v). O DNA foi sequenciado pelo método de terminação de cadeia fluorescente Sanger (Macrogen, Seoul, Coréia do Sul). As leituras obtidas foram analisadas com o auxílio do software CodonCodeAligner (Codon Code Corporation, V 8.0.1 Dedham, Massachusetts, Estados Unidos). A domesticação confirmada foi chamada de GB_UD_73A9.

3.1.3 Obtenção da unidade transcricional e do vetor binário

Para a reação de obtenção da unidade transcricional GB-UA_4357 (ED07_RS0204515 sob o comando do promotor P-*At*SUC2 e com o terminador T-NOS) foram utilizados 75 ng de GB_UD_73A9, 75 ng de GB_UD_27D8 (P-*At*SUC2+pUPD2), 75 ng de GB0037 (T-NOS+pUPD2), 75 ng do vetor pDGB3α2, 10 U da enzima *Bsm*BI (New England Biolabs), 3U da enzima T4 ligase e 1X tampão da

reação (Promega), num total de 10 µL de volume de reação. A transformação foi feita em *E. coli* JM109 por eletroporação e a seleção de colônias transformantes foi feita em meio LB contendo canamicina (50 µg/mL), IPTG (0,5 mM) e X-GAL (40 µg/mL). A confirmação da obtenção da unidade transcricional GB_UA_4357 em células de *E. coli* foi feita pela clivagem do DNA plasmidial de colônias selecionadas com as enzimas de restrição *DraI* e *PvuI* (Promega). A verificação do perfil da clivagem enzimática foi realizada em eletroforese em gel de agarose 1% (m/v).

Por fim, realizou-se a incorporação das unidades transcricionais GB_UA_4357 e GB0226 (neomicina fosfotransferase II sob o comando do promotor P-NOS e terminador T-NOS) no vetor pDGB3Ω1 para a obtenção do vetor binário final. Para tal foram utilizados 75 ng de GB_UA_4357, 75 ng de GB0226, 10 U da enzima *BsmBI* (New England Biolabs), 3U da enzima T4 ligase (Promega), 1X tampão da reação e 75 ng do vetor pDGB3Ω1. A reação de clivagem e ligação e a obtenção de transformantes foram realizadas nas mesmas condições descritas anteriormente. O antibiótico utilizado para seleção de colônias foi espectinomicina (50 µg/ mL). Ao final, o DNA plasmidial de colônias selecionadas foi utilizado em reação de clivagem com a enzima *DraI* (Promega) para confirmação de perfil. Adicionalmente, o DNA foi enviado para sequenciamento (Macrogen) e as leituras foram analisadas no CodonCodeAligner. A construção confirmada foi denominada MD26.

3.2 Obtenção de um vetor binário como alternativa ao sistema Golden Braid

Devido ao baixo número de eventos obtidos, como alternativa a utilização do sistema Golden Braid um outro vetor binário foi desenvolvido para expressão de ED07_RS0204515 em laranjeiras-doces. O plasmídeo *backbone* escolhido foi o pROKII (12.883 bp), disponível no laboratório de biotecnologia do Fundecitrus. Inicialmente 10 µg do vetor MD26 (9.866 bp) foram utilizados em uma reação de clivagem com a enzima *BamHI* (New England Biolabs), seguindo as recomendações do fabricante. Da mesma forma, 10 µg do pROKII também foram submetidos a clivagem com *BamHI*. Após incubação, as reações foram aplicadas em gel de agarose 1% (m/v) para eletroforese. O fragmento de 3,192 bp proveniente da clivagem de MD26 foi excisado do gel e purificado com kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). O plasmídeo pROKII linearizado (12.883 bp) também foi purificado.

Uma segunda reação de clivagem foi realizada, utilizando a enzima *Ac/I* (New England Biolabs) para o fragmento de 3.192 bp de MD26, e *Cl/I* (New England Biolabs) para pROKII linearizado. O produto da clivagem de MD26 foi submetido a gel de agarose e o fragmento de interesse de 1.866 bp (que contém a unidade transcricional de ED07_RS0204515) foi excisado e purificado. O fragmento resultante da digestão do pROKII linearizado, 11.597 bp foi purificado diretamente. Após quantificação, 100 ng do fragmento de 1.866 pb de MD26 e 70 ng do fragmento de 11.591 pb de pROKII foram utilizados em uma reação de ligação com T4 DNA ligase (Promega).

A reação de ligação foi empregada para transformação de células de *E. coli* JM109. A seleção de transformantes ocorreu em meio LB contendo o antibiótico canamicina (50 µg/mL). As colônias selecionadas foram cultivadas em 500 µL de meio líquido LB acrescido de antibiótico e 1 uL foi utilizado para realização da PCR de confirmação de clonagem. Os primers utilizados foram Lis_AtSUC2_F (AGATACCCTACGCTATAGACACA) e Lis_AtSUC2_R (CTCTTCTCTTAACAAGACCTGGAA). A PCR foi realizada em termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific), empregando a enzima GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. As condições das reações foram as seguintes: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 57 °C por 30 segundos e 72 °C por 60 segundos. A extensão final se deu a 72 °C por 10 minutos. O plasmídeo resultante recebeu a designação de MD29.

3.3 Transformação em *Agrobacterium tumefaciens*

As construções obtidas foram transformadas em *A. tumefaciens* estirpe EHA-105 por choque térmico (LACORTE; ROMANO, 1998). O cultivo desta bactéria foi realizado em meio 2xYT (Sigma-Aldrich) líquido, sob agitação, a 28 °C durante período que variou entre 4 e 24 horas, ou meio sólido (5% ágar (m/v)) a 28°C. Os antibióticos rifampicina e espectinomicina foram adicionados, conforme necessário, nas concentrações de 50 µg/ mL e 100 µg/ mL, respectivamente.

Para a etapa de transformação primeiramente foram obtidas células competentes de *A. tumefaciens* EHA-105 (LACORTE; ROMANO, 1998). Uma colônia

foi inoculada a partir do estoque a - 80 °C em 10 mL de meio 2xYT líquido na presença do antibiótico rifampicina (50 µg/ mL). A cultura foi mantida sob agitação constante de 150 rpm em estufa a 28 °C por 24 horas. Na sequência, foram inoculados 8 mL da cultura em 200 mL de 2xYT na presença de rifampicina (50 µg/ mL). A cultura foi mantida sob agitação em estufa a 28 °C por aproximadamente 4 horas até atingir uma densidade ótica (OD₆₀₀) entre 0,6 e 1,0. Posteriormente, a cultura foi resfriada em gelo por 1 hora. Realizou-se uma centrifugação a 5.000 x *g* (4 °C) por 20 minutos, e o precipitado bacteriano resultante foi submetido a três lavagens com CaCl₂ (cloreto de cálcio) 10 mM. Cada lavagem envolveu ciclos de centrifugação a 5.000 x *g* (4 °C) por 10 minutos. O precipitado foi então homogeneizado em 5 mL de CaCl₂ 10 mM e alíquotas de 100 µL da suspensão celular foram feitas em microtubos de 0,5 mL. Estes foram armazenados em ultrafreezer a -80 °C para futuros experimentos.

Para as transformações, nas células competentes ainda congeladas, foram adicionados 10 µg de DNA das construções plasmidiais. As misturas foram incubadas em banho-maria à 37 °C (5 minutos) e em seguida acondicionadas em gelo por 2 minutos. Foram adicionados a cada microtubo 1 mL de meio 2xYT e estes foram incubados sob agitação constante de 150 rpm a 28 °C por 4 horas. As misturas foram centrifugadas a 2700 x *g*, 4 °C por 5 minutos e os precipitados resultantes homogeneizados em 200 µL de 2xYT. Por fim, as células foram espalhadas em placas contendo meio 2xYT sólido (5% ágar (m/v)) e os antibióticos espectinomicina (100 µg/ mL) e rifampicina (50 µg/ mL) para seleção de transformantes. As placas permaneceram incubadas a 28 °C por 48 horas. As colônias selecionadas foram cultivadas em 10 mL do meio 2xYT líquido acrescido de antibióticos.

A confirmação de transformação foi realizada através da PCR do DNA plasmidial de colônias selecionadas com os primers Las_1_Fwd (CTTCACCTGTTTCAGCAAGTCTC) e Las_1_Rvs (GGATAGCTATAAGGAATGGAAG) para PAS2, Lam_1_Fwd (GTTTCATTTCAATTTGGAGAGGACTC) e Lam_1_Rvs (GACCATTAACAATTGTCTTTTCATG) para PAS3, Lis_opt_F2 (AGGAAGCTGAAGATTTCTTCTTA) e Lis_opt_R2 (GAACCTTACCACCAGCCTTT) para MD26 e Lis_AtSUC2_F (AGATACCCTACGCTATAGACACA) e Lis_AtSUC2_R (CTCTTCTCTTAACAAGACCTGGAA) para MD29.

As amplificações foram conduzidas em um termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific), empregando a enzima GoTaq Flexi DNA

Polymerase (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. As condições das reações foram as seguintes para os primers destinados à confirmação das construções PAS2 e PAS3: desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 62 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos e extensão final a 72 °C por 5 minutos. Para confirmação das construções MD26 e MD29 as condições foram: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 57 °C por 60 segundos, 72 °C por 30 segundos, e extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1% (m/v). Colônias confirmadas foram utilizadas em posteriores transformações em tecido adulto de plantas de laranja-doce.

3.4 Transformação genética de tecido adulto e obtenção de laranjeiras-doces GM

3.4.1 Preparo do inóculo de *Agrobacterium tumefaciens*

As colônias isoladas de *A. tumefaciens* carregando os plasmídeos de interesse foram cultivadas em 50 mL de meio 2xYT na presença de rifampicina e espectinomicina (50 µg/ mL e 100 µg/ mL, respectivamente). As culturas foram incubadas sob agitação de 150 rpm a 28°C por 24 horas. Após ajuste da OD₆₀₀ para 0,4, as culturas foram centrifugadas a 1700 x g (4 °C) durante 15 minutos. Os precipitados celulares resultantes foram homogeneizados em 20 mL de meio MS líquido (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e 200 µM de acetoseringona foram adicionados. Por fim, o volume foi ajustado para 50 mL.

3.4.2 Preparo e infecção dos explantes

Foram utilizados brotos (estágio V4/V5) de mudas de laranjeira-doce das variedades 'Pera' e 'Valencia' como explantes para a transformação genética (KOBAYASHI et al., 2003). As mudas das quais os brotos foram retirados são obtidos através da enxertia de borbulhas de plantas matrizes 'Pera' ou 'Valencia' em limoeiro 'Cravo' (*citrus limonia*). As borbulhas enxertadas permanecem por 20 dias amarradas com fitilhos para garantir umidade e promover a conexão dos tecidos. Após 2 meses da enxertia, é realizada a poda do limoeiro 'Cravo' e somente a copa de laranja-doce permanece. Quando o material está lignificado é realizada outra poda (20 cm acima da enxertia) e as brotações resultantes são coletadas e utilizadas nas transformações.

A escolha de tecido maduro se deu como forma de evitar o longo período juvenil associado a tecidos mais jovens como o caso dos hipocótilos (PEÑA et al., 2008). No ambiente de fluxo laminar, os brotos com aproximadamente 18-20 cm foram submetidos a uma solução de hipoclorito de sódio 1% (v/v) com adição de 3 gotas de Tween-20 (Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemanha), por um período de 15 minutos. Após esse tratamento, os brotos foram cuidadosamente lavados em água ultrapura, em quatro ciclos de lavagem. Em seguida, os brotos foram segmentados (entre os entrenós) em explantes com aproximadamente 2 a 4 mm de tamanho com auxílio de um bisturi. Esses explantes foram colocados em placas de Petri contendo papel filtro umedecido com água ultrapura. A transformação seguiu o descrito em KOBAYASHI et al. (2003). As suspensões bacterianas de *A. tumefaciens* preparadas anteriormente foram depositadas nos explantes e mantidas em contato por 5 minutos. Para remover o excesso de suspensão bacteriana, os explantes foram transferidos para papel filtro estéril. Os explantes de controle, que não foram expostos à suspensão bacteriana contendo as construções, foram utilizados como controle positivo para regeneração e como controle negativo para testes subsequentes na seleção de tecidos não transformados.

3.4.3 Co-cultivo e regeneração das gemas

Os explantes obtidos foram transferidos para placa de Petri contendo meio de co-cultivo WPM (Woody Plant Medium) modificado (LLOYD; MCCOWN, 1980). As placas foram vedadas com parafilme e mantidas na ausência de luz por 3 dias na

temperatura de 26 °C. Após, os explantes foram transferidos para o meio de regeneração WPM modificado contendo cefotaxima (150 µg/ mL) e timetin (300 mg/L) para eliminar resquícios de *A. tumefaciens*, 1,8 µM de benzilaminopurina (BAP) e 1,16 µM de GA₃ (ácido giberélico) para promover regeneração do tecido e o desenvolvimento das gemas e canamicina (75 µg/ mL) para selecionar gemas transformadas. Os explantes foram mantidos em câmara de crescimento a 26 °C na ausência de luz. De acordo com o aparecimento de gemas nos explantes, fez-se a transferência das placas para sala de cultivo *in vitro* na presença de luz (~45 µmol m⁻²s⁻¹) e temperatura e umidade controladas (25 °C ±1, 50-75%, respectivamente). Quinzenalmente foram feitas transferências dos explantes para meio WPM fresco a fim de se evitar agentes contaminantes ou oxidações. Em média, foram realizadas três transferências até a utilização das gemas para microenxertia.

3.4.4 Microenxertia e confirmação de gemas GM

As gemas obtidas dos explantes da etapa anterior foram enxertadas em citrange 'Troyer' [*Citrus sinensis* (L.) Osb. X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]. As plântulas de citrange 'Troyer' são geradas a partir de sementes obtidas de frutos coletados no campo. Inicialmente, as sementes são submetidas a um tratamento térmico a 60 °C e também a um tratamento com fungicida (durante 30 minutos) para eliminar possíveis patógenos. Em seguida, são semeadas em meio de cultura MS sólido (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contido em tubos e após um período de 20 dias em câmara de crescimento, as plântulas provenientes estão prontas para uso como porta-enxerto nas microenxertias.

Os ensaios foram conduzidos cerca de duas a três semanas após o início da formação das gemas. Em um ambiente de fluxo laminar, foram preparadas placas de Petri contendo papel filtro umedecido com água ultrapura estéril. Nestas placas, realizou-se a remoção da ponta da raiz, dos hipocótilos, das gemas laterais e da parte superior (incluindo as folhas) do porta-enxerto. Em seguida, efetuou-se um corte em formato de "L" na haste do porta-enxerto para acomodar a gema. A gema foi retirada dos explantes e cortada de modo a criar um encaixe na base do corte em "L". A microenxertia foi mantida sob condições de luz semelhantes às dos explantes originais. Dois meses após, foram coletados pequenos fragmentos das folhas emitidas das plantas regeneradas para extração de DNA genômico através do método CTAB

(MCGARVEY; KAPER, 1991). A inserção do T-DNA ao DNA genômico das plantas foi confirmado via PCR utilizando-se os primers descritos na Tabela 5. O protocolo é o mesmo descrito no item 3.3 para confirmação de transformação. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1% (m/v). As laranjeiras-doces variedade ‘Pera’ ou ‘Valencia’ GM foram transferidas para casa de vegetação e sobre-enxertadas em limoeiro ‘Cravo’. A descrição detalhada sobre o processo de enxertia pode ser consultada no item 3.6. Após 2 meses, uma segunda PCR de confirmação foi realizada. Os primers e as condições são as mesmas utilizadas anteriormente.

Tabela 5. Primers utilizados para confirmação de inserção do T-DNA contendo os transgenes SC1_gp060 (PAS2) lam_678 (PAS3) e ED07_RS0204515 (MD26/ MD29) em eventos GM de laranjeiras-doces.

Primer	Sequência 5’ – 3’	Construção	T (°C)	Referência
Las_1_Fwd	CTTCACCTGTTTCAGCAAGTCTC	PAS2	62	Este trabalho
Las_1_Rvs	GGATAGCTATAAGGAATGGAAG	PAS2	62	Este trabalho
Las_4_Fwd	ATGGAAGAGCCTTAGCCCAG	PAS2	62	Este trabalho
Las_2_1Rvs	TTGTATAAAGTGGTGGTTGTTTC	PAS2	62	Este trabalho
Lam_1_Fwd	GTTCATTTCAATTTGGAGAGGACTC	PAS3	62	Este trabalho
Lam_1_Rvs	GACCATTAAACAATTGTCTTTTCATG	PAS3	62	Este trabalho
Lam_3_Fwd	ATTAATAAGGATGCTGGTGATC	PAS3	62	Este trabalho
Lam_3_Rvs	CAAATGTTTGAACGATCGGG	PAS3	62	Este trabalho
Lis_opt_F2	AGGAAGCTGAAGATTCCTTCTTA	MD26	57	Este trabalho
Lis_opt_R2	GAACCTTACCACCAGCCTTT	MD26	57	Este trabalho
Lis_AtSUC2_F	AGATACCCTACGCTATAGACACA	MD26, MD29	60	Este trabalho
Lis_AtSUC2_R	CTCTTCTCTTAACAAGACCTGGAA	MD26, MD29	60	Este trabalho
NPTII-F	GACGAGGCAGCGCGGCTAT	PAS2, PAS3, MD26 e MD29	60	Este trabalho
NPTII_GB-R	AAGAAGGCGATAGAAGGCTA	PAS2, PAS3, MD26 e MD29	60	Este trabalho

Fonte: a autora

3.5 Southern-Blot

A verificação da integridade da região do T-DNA e também o número de cópias inseridas no genoma das plantas GM obtidas foi feita através da análise de Southern Blot em plantas matrizes PAS2 e MD26, conforme descrito por TRIJATMIKO et al. (2016). Utilizou-se 1 g de tecido vegetal proveniente de folhas em estágio V5/V6 (CIFUENTES-ARENAS et al., 2018). Para a verificação de integridade do T-DNA em eventos da construção PAS2, foram utilizadas as enzimas de restrição *RsrII* e *DraII* (New England Biolabs), enquanto que para o número de cópias do T-DNA, a enzima

AatII (New England Biolabs) foi empregada. Já para os eventos da construção MD26, a integridade e o número de cópias do T-DNA foram verificados pelo emprego das enzimas *BamHI* (Thermo Fisher Scientific) e *HindIII* (New England Biolabs) respectivamente. Utilizou-se 50 µg de DNA na reação de clivagem e o protocolo seguido foi de acordo com as instruções do fabricante. Para a produção de sondas utilizou-se os primers descritos na Tabela 5. Até o momento só foi possível a realização de Southern-blot dos eventos PAS2 e MD26, sendo assim, todos os ensaios posteriores estão direcionados exclusivamente a esses eventos.

3.6 Propagações e manutenção de laranjeiras-doces

O porta-enxerto utilizado para as propagações das mudas de laranja-doce é o limoeiro 'Cravo'. Para a obtenção deste porta-enxerto, são coletados frutos no campo e as sementes são selecionadas. As sementes passam por um tratamento térmico a 60 °C assim como também tratamento fúngico para inativação de patógenos. Posteriormente as sementes são semeadas em substrato fibra de coco contido em tubetes. Após período de crescimento, as mudas são transplantadas para vaso com fibra de coco e em um período entre 6 a 8 meses podem ser utilizadas como porta-enxerto. A nutrição das plantas é fornecida através de fertirrigação e o controle de pragas mediante tratamentos fitossanitários.

As propagações das matrizes foram feitas após 6 meses da realização da segunda PCR de confirmação da inserção do T-DNA. O método utilizado foi o de enxertia de borbulhas em porta-enxerto de limoeiro 'Cravo'. As borbulhas retiradas das matrizes foram inseridas no caule do limoeiro 'Cravo' usando o método de T invertido, que consiste um corte em forma de "T" invertido no tronco do porta-enxerto. Fitolhos foram amarrados nas enxertias para manter a umidade e permitir união dos tecidos. Após 20 dias, os fitolhos usados para fixar as borbulhas foram removidos. Após um mês, o porta-enxerto foi podado para favorecer o desenvolvimento das novas laranjeiras-doces. Quando o material estava lignificado a primeira poda da copa de laranja-doce foi realizada 20 cm acima da enxertia. Inicialmente foram realizadas 8 propagações a partir das matrizes. Após 6 a 8 meses, as 8 propagações iniciais foram utilizadas para a realização do restante das propagações, seguindo o mesmo procedimento.

A manutenção das plantas foi feita periodicamente através da remoção de brotos do porta-enxerto e podas da copa para nivelamento. A irrigação foi realizada três vezes por semana com um volume de aproximadamente 250 mL de água por planta. Semanalmente, as plantas foram irrigadas também com uma solução nutritiva contendo os seguintes fertilizantes (em g. L⁻¹ de água): Nitrato de cálcio, 0,9; Nitrato de potássio, 0,3; MAP, 0,07; Sulfato de magnésio, 0,26; Cobre-ácido etileno diamino tetracético (EDTA) (14,5% Cu), 0,01; Zinco-EDTA (14% Zn), 0,007; Manganês-EDTA (13% Mn), 0,005; Ácido Bórico, 0,0035; Molibdato de Amônio, 0,0003; e Ferro- ácido dietileno diamino hidróxidofenilacético (EDDHA) (6% Fe), 0,05.

3.7 Análise de expressão gênica relativa dos transgenes em laranjeiras-doces GM

3.7.1 Extração do RNA total

Amostras de plantas matrizes e suas propagações foram coletadas. Em microtubos de 2 mL contendo esferas metálicas foram amostrados três discos foliares de brotos estágio V2/V3 (CIFUENTES-ARENAS, 2018). Após a coleta, os microtubos foram imersos imediatamente em nitrogênio líquido (N₂) e as amostras foram maceradas em aparelho TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Renânia do Norte-Vestfália, Alemanha) por três períodos de 45 segundos cada. Foi adicionado às amostras 1 mL do reagente Trizol (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos.) contendo 5% de β-mercaptoetanol. Os microtubos foram deixados em banho de gelo durante 5 minutos. Adicionou-se 0,5 mL de clorofórmio e homogeneizou-se durante 15 segundos. Novamente os microtubos foram deixados em banho de gelo por 5 minutos e em seguida foram centrifugados a 12000 x g (4 °C) durante 20 minutos. A fase superior foi transferida para um novo microtubo o qual foram adicionados 0,4 mL de solução de precipitação contendo 0.8 M de Na₃C₆H₅O₇ (citrato de sódio) e 1.2 M de NaCl (cloreto de sódio). Em seguida adicionou-se 0,4 mL de isopropanol (P.A.) e a mistura foi armazenada por 20 minutos em freezer a - 20 °C. As amostras foram centrifugadas a 12000 x g (4 °C) durante 20 minutos e após descarte do sobrenadante o precipitado restante foi lavado duas vezes com etanol 70 % (v/v). O equipamento Concentrator plus (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) foi utilizado durante 5 minutos para remover o excesso de água das amostras. O

precipitado foi homogeneizado em 50 μ L de água DEPC (Dietilpirocarbonato) e incubado em banho-maria 50 °C durante 10 minutos. Em uma etapa adicional de purificação, foram adicionadas as amostras 0,2 mM de NaCl e 2,5 volumes de etanol (P.A.). Elas foram mantidas em ultrafreezer - 80 °C durante 20 min e centrifugadas a 12000 x g (4 °C) durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado remanescente foi lavado por duas vezes com 1 mL de etanol 70 % (v/v). O excesso de etanol foi removido através de secagem em equipamento Concentrator plus (Eppendorf). Por fim o precipitado foi homogeneizado em 50 μ L de água DEPC. Realizou-se a quantificação do RNA total extraído em equipamento NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). As amostras foram armazenadas em ultrafreezer - 80 °C até a utilização.

3.7.2 Tratamento com DNase e Síntese do cDNA

Alíquotas de 1 μ g do RNA obtido anteriormente foram tratadas com Turbo DNaseTM RNA free (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as recomendações do fabricante. Para a reação de transcrição reversa foram utilizados 5 μ g de RNA total, 1 μ L de RNA OUT (Invitrogen- Thermo Fisher Scientific), 0,5 μ M de Oligo dt, 0,25 mM de dNTPs, 2 U da enzima Improm IITM Reverse Transcriptase (Promega), 1X ImpromIITM Buffer e 3 mM de MgCl₂ (cloreto de magnésio), em um volume final de 20 μ L. A reação ficou incubada a 42 °C por 1 hora e, posteriormente, a inativação da enzima ocorreu a 70 °C por 5 minutos.

3.7.3 Quantificação e análise de expressão gênica via RT-qPCR

Para a amplificação dos transcritos de SC1_gp060 foram empregados os primers Las_RT1_F (5' GCTACAGTTGCTACAGCTGC 3') e Las_RT1_R (5' AGCAAGATCGCTAGCACCAG 3'). Já para os transcritos de ED07_RS0204515 os primers ED07_F_exp (5' GACTTGTTGCTGTTGCTGATTT 3') e ED07_R_exp (5' CCAGCCTTTGTCCACTTCTT 3') (Elaine Martins, não publicado) foram utilizados. Os genes de referência gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase C2 (GAPC2) e actina (ACT) foram utilizados como controles internos da expressão (MAFRA et al., 2011), através da utilização dos respectivos primers GAPC2F (5' TCTTGCCTGCTTTGAATGGA 3') e GAPC2R (5' TGTGAGGTCAACCACTGCGACAT

3'), e ACT_F (5' CATGAAGTGTGATGTGGATATTAG 3') e ACT_R (5' TGATTTTCCTTGCTCATACGG 3'). A reação de qPCR foi realizada utilizando-se o kit SYBR Green Master Mix 1X (Ambion – Thermo Fisher Scientific), 0,4 mM de cada oligo e 1 µL do cDNA, em um volume final de 12 µL. A amplificação foi realizada em equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems – Thermo Fisher Scientific) nas seguintes condições: 10 minutos a 95°C; 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C; 1 minuto a 60°C; 15 segundos a 95 °C e por fim 1 minuto a 60 °C. Ao final foi analisada a curva de dissociação dos produtos das amplificações na faixa de temperatura de 60 °C a 90 °C com incremento de 0,3 °C por segundo. As reações de expressão para o gene alvo e genes referência foram feitas em triplicata biológica. A eficiência dos primers foi analisada com base no valor do *slope* obtidos em qPCR com diluições em série de DNA (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 ng). A quantificação da expressão dos genes foi feita com base no valor de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (*cycle threshold*) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) sendo a expressão relativa do gene alvo normalizada em relação aos genes referência. Os cálculos se baseiam na equação $ER=2^{-\Delta\Delta C_t}$ onde:

ER = expressão relativa

C_t = *threshold cycle*

ΔC_t = (alvo – referência)

$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ gene-alvo} - \Delta C_t \text{ amostra controle}$

Quantidade relativa = $2^{-\Delta\Delta C_t}$

3.8 Análise fenotípica

As plantas GM dos eventos PAS2 e MD26 foram avaliadas fenotipicamente e comparadas aos controles. Os dados foram coletados das oito propagações de cada evento obtido a partir das matrizes. Além disso, foram utilizadas oito propagações de eventos controle com vetor vazio (P-pBIM-19-11 ou V-C(2)) e também de plantas NT. No momento da realização da análise fenotípica, plantas do evento PAS2, assim como seus controles, apresentavam idade de 20 meses enquanto que plantas do evento MD26 e seus controles apresentavam idade de 10 meses.

Foram realizadas medidas de diâmetro em 10 pontos diferentes do ramo principal, desde o ponto de enxertia até o ápice com auxílio de um paquímetro. Foram obtidas também medidas de 50 entrenós iniciais do mesmo ramo principal após a

enxertia com auxílio de uma régua. Adicionalmente, a área de 12 folhas selecionadas aleatoriamente ao longo do ramo principal foi avaliada. As folhas foram escaneadas e sua área foi calculada utilizando o software 'ImageJ' (<https://imagej.nih.gov/ij>).

Os valores obtidos para todas as medições foram utilizados para cálculos de médias e erro e padrão e foram comparados por Tukey ($p \leq 0,05$).

3.9 Desafio de laranjeiras-doces GM frente a CLas e CLam

3.9.1 Inoculações de CLas e CLam em propagações do evento PAS2

A avaliação da atividade da bacteriocina SC1_gp060 sobre o título de CLas e CLam e também da lisozima ED07_RS0204515 sobre o título de CLas foi realizada através do desafio de propagações dos eventos de PAS2 e MD26 frente a estes patógenos. As propagações foram geradas conforme descrito no item 3.6. Laranjeiras-doces 'Pera' do evento pBIM-19-11 sobre limoeiro 'Cravo' e laranjeiras-doces 'Valencia' do evento C(2) sobre limoeiro 'Cravo' (Fundecitrus) foram utilizadas como controles do vetor vazio. Adicionalmente laranjeiras-doces 'Pera' ou 'Valencia', sobre limoeiro 'Cravo' foram utilizadas como controle não transformado (NT). Aos 6 meses após a propagação, as plantas foram inoculadas via enxertia, conforme descrito por LOPES e FRARE (2008). Cada planta a ser desafiada com CLas recebeu uma borbulha proveniente de plantas contendo o isolado 9PA e cada planta a ser desafiada com CLam recebeu duas borbulhas provenientes de plantas contendo o isolado São Paulo. Em ambos os casos a enxertia da borbulha usada como inóculo foi feita no porta-enxerto. Foram utilizadas borbulhas sadias e borbulhas de plantas fonte de CLas ou CLam, a depender do tratamento. Todas as plantas utilizadas como fonte foram previamente validadas via PCR para a presença de CLas ou CLam (LI et al., 2006) e apresentam sintomas característicos de HLB. Ao total foram realizados três experimentos, sendo que nos experimentos 1 e 2 utilizou-se propagações dos eventos de PAS2 e no experimento 3, utilizou-se propagações dos eventos MD26 (Tabela 6).

Tabela 6. Laranjeiras-doces GM dos eventos PAS2, MD26 e controles propagadas e desafiadas contra CLas e CLam

Experimentos 1 e 2		Inóculo utilizado		
Evento	CLas	CLam	Sadio	
P-NT	25	150	15	
P-pBIM-19-11	25	150	15	
P-PAS2-1	25	150	15	
P-PAS2-2	25	150	15	
P-PAS2-3	25	150	15	
Total	125	750	75	

Experimento 3		Inóculo utilizado		
Evento	CLas		Sadio	
V-NT	15		5	
V-C(2)	15		5	
V-MD26-36	15		5	
V-MD26-48	15		5	
V-MD26-53	15		5	
V-MD26-59	15		5	
V-MD26-60	15		5	
V-MD26-76	15		5	
P-MD26-84	15		5	
Total	135		45	

Fonte: a autora

3.9.2 Detecção e quantificação do título de CLas e CLam em laranjeiras-doces GM expressando SC1_gp060 e ED07_RS0204515

A partir da enxertia e desafio das plantas pela inoculação de CLas ou CLam, foram realizadas amostragens ao longo do tempo da seguinte maneira: para os experimentos 1 e 2, aos 60, 120, 180 e 360 dias após a inoculação (DAI); enquanto para o experimento 3 foram feitas amostragens a cada 21 dias, durante 252 dias. Nos três experimentos coletou-se de 3 a 4 folhas de cada planta para extração de DNA conforme MURRAY e THOMPSON (1980) adaptado por TEIXEIRA et al. (2005). A confirmação da presença de CLas ou CLam foi realizada por qPCR de acordo com o protocolo RPL (MARTINS, 2023). Amostragens da casca, abaixo do local da enxertia via borbulha, foram realizadas conforme necessidade. A extração do DNA e a

detecção do patógeno seguiu o mesmo procedimento de diagnóstico mencionado acima.

Para a avaliação do título bacteriano, as médias dos valores de Log de CLas e CLam foram comparadas nos diferentes períodos amostrados por Tukey ($p \leq 0,05$). As frequências de detecção ao longo do tempo foram comparadas entre as propagações dos eventos P-PAS2-1, P-PAS2-2, P-PAS2-3 e P-pBIM-19-11 em relação ao grupo controle não transformado P-NT, assim como também dos eventos V-MD26-36, V-MD26-48, V-MD26-53, V-MD26-59, V-MD26-60, V-MD26-76, P-MD26-84, V-C(2) e V-NT, pelo teste χ^2 ($p \leq 0,05$). Os cálculos foram realizados com o auxílio do programa Statistica e os gráficos foram gerados com o auxílio do programa GraphPad Prism (www.graphpad.com).

3.9.3 Quantificação da expressão gênica de SC1_gp060 em eventos de Laranjeiras-doces sob regulação do promotor *AtSUC2* em resposta a infecção por CLas

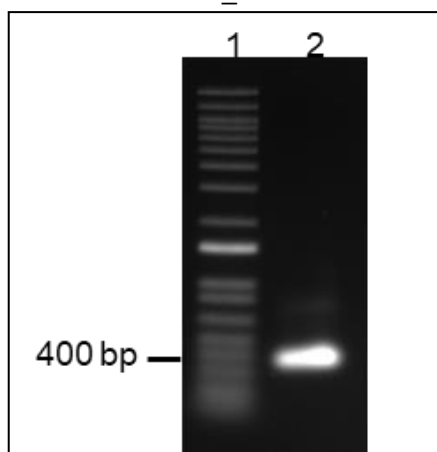
Broto em estágio V2/V3 das propagações de PAS2, tanto infectados com CLas (aos 360 DAI) quanto sadios (experimento 1), foram coletados para a extração de RNA. Após a síntese do cDNA, os níveis de expressão gênica foram quantificados. As etapas de coleta, extração do RNA, síntese do cDNA, análise da expressão gênica e cálculos seguiram as descrições detalhadas no item 3.6.

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção dos cassetes de expressão de ED07_RS0204515 em sistema Golden Braid

A PCR utilizando o molde plasmidial ED07_RS0204515 em pUC57 gerou um fragmento de 364 bp correspondente ao gene da lisozima com códons otimizados para citros (Figura 19).

Figura 19. Perfil de amplificação da PCR de ED07_RS0204515 com códons otimizados.

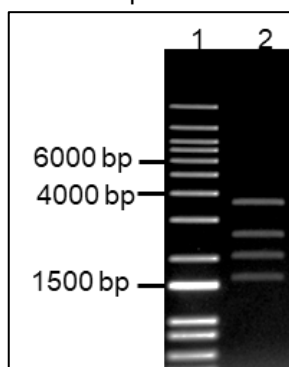


O fragmento resultante da PCR corresponde a 364 bp (canaleta 2). A canaleta 1 indica o marcador molecular 1 Kb plus (Invitrogen).

Fonte: a autora

A obtenção de ED07_RS0204515 em pUPD2, denominada de GB_UD_73A9, foi confirmada pelo perfil apresentado na clivagem com a enzima *NotI* (Apêndice A). Além disso, a análise do sequenciamento do DNA desta construção revelou uma correspondência de 100% com a sequência teórica esperada (dados não apresentados). Igualmente, a unidade transcricional GB_UA_4357 foi confirmada através do perfil de clivagem apresentado quando as enzimas *DraI* e *PvuI* foram empregadas (Apêndice B). Por fim, a clivagem da construção final MD26 com a enzima *DraI* resultou em um perfil que confirma o teórico esperado (Figura 20).

Figura 20. Perfil de clivagem de MD26 com *DraI* para confirmação de obtenção do vetor binário.

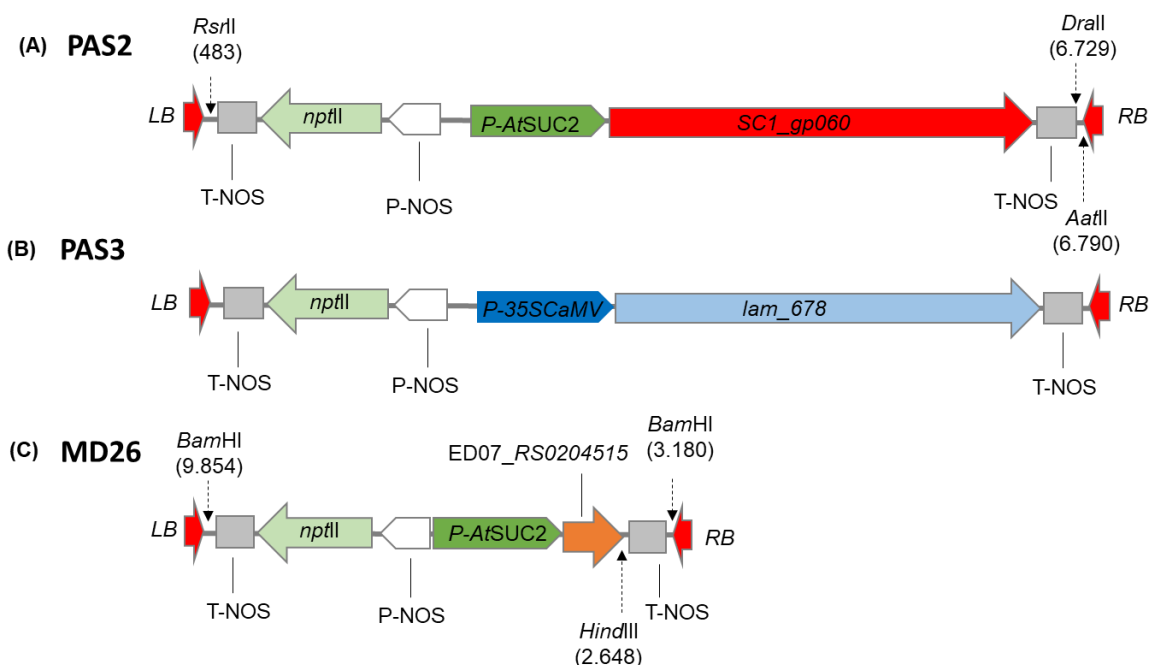


A clivagem com a enzima *DraI* resultou em fragmentos de 3.610 bp, 2.572 bp, 2.056 bp e 1.628 bp. A canaleta 1 indica o marcador molecular 1 Kb plus (Invitrogen).

Fonte: a autora

O resultado do sequenciamento de MD26 indicou 100% de identidade com o esperado teórico para essa construção (dados não apresentados). A Figura 21 apresenta a região do T-DNA de PAS2, PAS3 e MD26, obtidas em sistema Golden Braid.

Figura 21. Representação esquemática da região do T-DNA das construções PAS2 (A), PAS3 (B) e MD26 (C) obtidas pelo sistema *Golden Braid*.



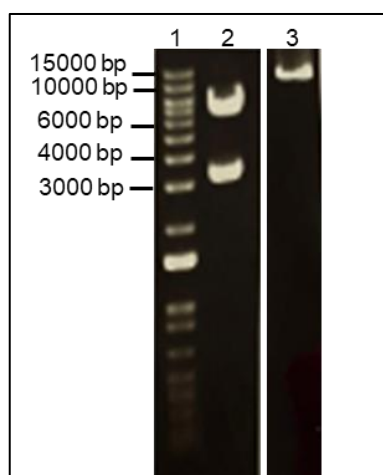
Bacteriocinas SC1_gp060 2PA (A) e lam_678 (B) e Lisozima ED07_RS0204515 (C). LB: borda esquerda; RB: borda direita; P-AtSUC2: promotor do gene transportador de sucrose II de *Arabidopsis thaliana*. P-35SCaMV: promotor do Vírus do Mosaico da Couve-Flor. T-NOS: terminador do gene da nopalina sintase de *A. tumefaciens*; P-NOS: promotor do gene da nopalina sintase de *A. tumefaciens*; *nptII*: gene da neomicina fosfotransferase II. Setas pretas pontilhadas evidenciam o sitio de clivagem das enzimas indicadas

Fonte: a autora

4.2 Obtenção de um vetor binário como alternativa ao sistema Golden Braid

A clivagem de MD26 com *Bam*HI resultou em fragmentos de 3.192 bp e 6.674 bp, já pROKII apresentou o perfil linearizado de 12.883 bp (Figura 22).

Figura 22. Perfil de clivagem de MD26 e pROKII com a enzima *Bam*HI.

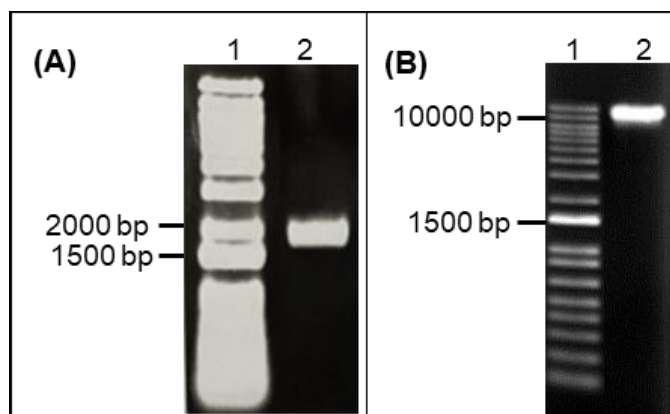


As canaletas 2 e 3 referem-se respectivamente às reações de clivagem com *Bam*HI de MD26 (6.674 bp e 3.192 bp) e pROKII (12.883 bp). A canaleta 1 indica marcador Molecular 1 kb plus (Invitrogen)

Fonte: a autora

O fragmento de 3.192 bp restringido com a enzima *Ac*I resultou em fragmentos de 1.866 bp e 1.326 bp, sendo que o primeiro, de interesse, foi excisado do gel (Figura 23A). O pROKII por sua vez após ser restringido com a enzima *Cl*aI, resultou em um fragmento de 11.597 bp (Figura 23B).

Figura 23. Perfil de clivagem de MD26 e pROKII com as enzimas *Ac*I e *Cl*aI.

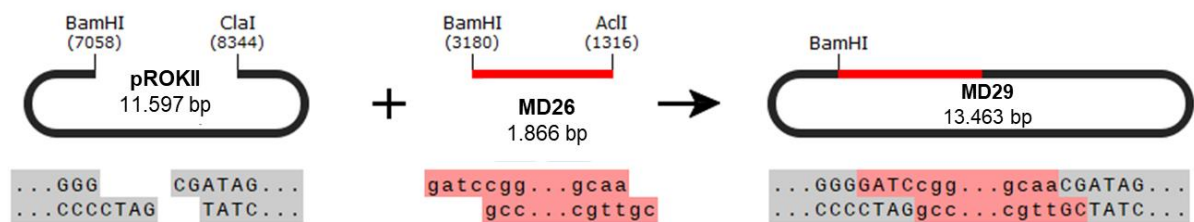


A canaleta 2 em (A) refere-se ao fragmento de 1.866 bp resultante da clivagem de MD26 com a enzima *Cl*aI. A canaleta 2 em (B) refere-se à clivagem de pROKII com *Ac*I. A canaleta 1 em (A) e (B) indica o marcador Molecular 1 kb plus (Invitrogen).

Fonte: a autora

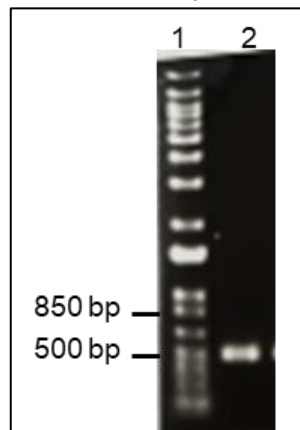
Após clivagem com a enzima *AcI*, cujo sítio de reconhecimento é AA[^]CGTT, é gerada uma extremidade complementar ao fragmento que foi restringido por *ClaI* AT[^]CGAT (Figura 24). Desta maneira foi possível obter a construção MD29, cuja confirmação por PCR resultou no fragmento de 493 bp (Figura 25). A região do T-DNA está representada na Figura 26.

Figura 24. Representação esquemática da obtenção do vetor binário MD29 por clivagem enzimática e ligação.



Fonte: Snapgene

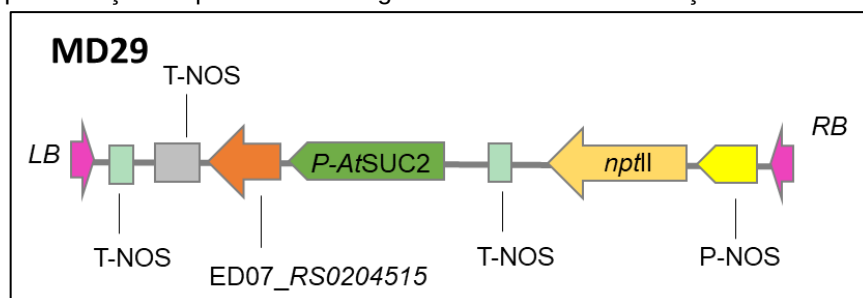
Figura 25. Perfil de amplificação via PCR de MD29 a partir de colônias de *E. coli* JM109.



A canaleta 2 refere-se ao fragmento de 493 bp gerado pela amplificação de ED07_RS0204515 em colônias de *E. coli* JM109 transformadas com MD29. A canaleta indica o marcador Molecular 1 kb plus (Invitrogen).

Fonte: a autora

Figura 26. Representação esquemática da região do T-DNA da construção MD29.

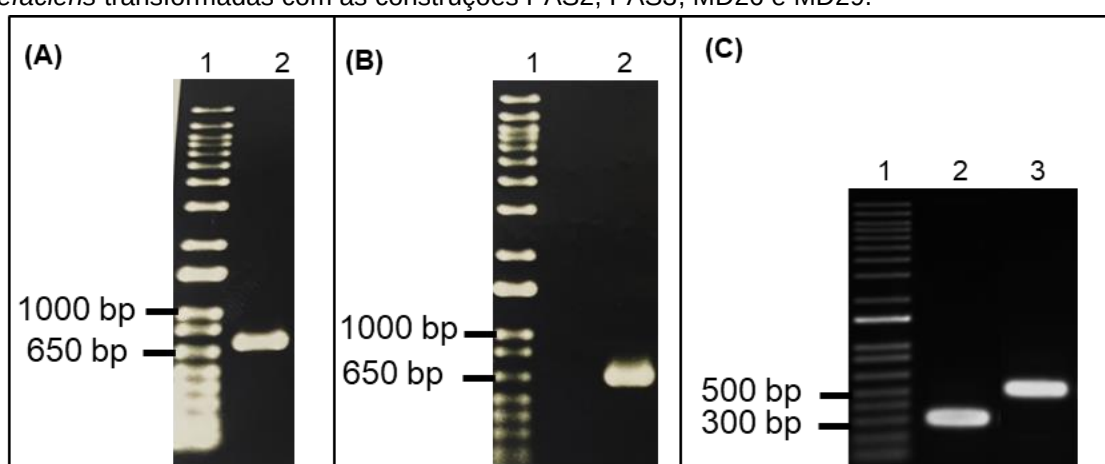


Fonte: a autora

4.3 Obtenção de laranjeiras-doces GM expressando SC1_gp060 e ED07_RS020515

A presença dos plasmídeos nas colônias transformadas de *A. tumefaciens* foi confirmada por reações de PCR do DNA plasmidial. Fragmentos específicos de 716 pb (PAS2), 639 pb (PAS3) e 237 pb (MD26 e MD29) foram gerados, como evidenciado na Figura 27.

Figura 27. Perfil de amplificação via PCR utilizando DNA plasmidial extraído a partir de colônias de *A. tumefaciens* transformadas com as construções PAS2, PAS3, MD26 e MD29.



Em (A) a canaleta 2 refere-se ao fragmento de 716 pb gerado pela amplificação de SC1_gp060 (PAS2); em (B) a canaleta 2 refere-se ao fragmento 639 pb gerado pela amplificação de lam_678 (PAS3); em (C) as canaletas 2 e 3 refere-se ao fragmento 237 pb gerado pela amplificação de ED07_RS0204515 (MD26) e 493 pb gerado pela amplificação da região da junção do gene da lisozima ED07_RS0204515 e do gene do promotor *AtSUC2* (MD29). A canaleta 1 em (A) (B) e (C) indica o marcador molecular 1 Kb plus (Invitrogen).

Fonte: a autora

Por meio do processo de transformação utilizando *A. tumefaciens*, foram gerados três eventos em laranja-doce 'Pera' provenientes da construção PAS2, dois eventos provenientes da construção PAS3, um evento proveniente da construção MD26 e dois eventos provenientes da construção MD29. Além disso, em laranjeiras-doces 'Valencia' foram gerados seis eventos provenientes da construção MD26 e cinco provenientes da construção MD29 (Tabela 7).

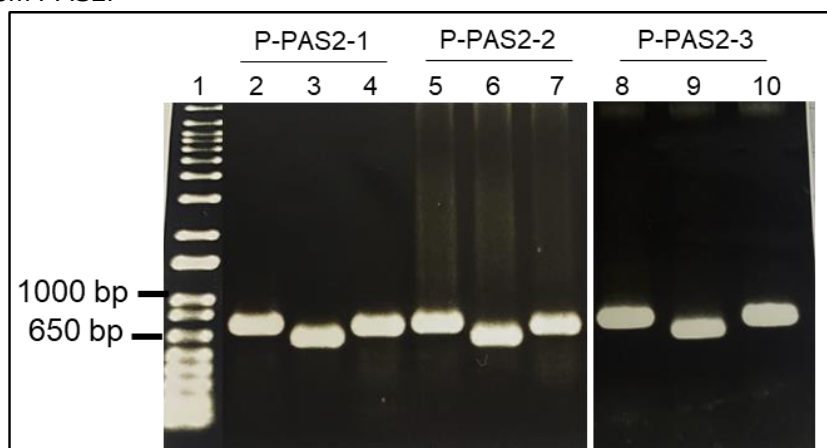
Tabela 7. Eventos de transformação genética de laranjeira-doce das variedades Pera e Valencia, obtidos a partir das construções genéticas PAS2, PAS3 e MD26.

Construção	T-DNA	Eventos 'Pera'	Eventos 'Valencia'
PAS2	T-NOS: <i>nptII</i> :P-NOS:P-AtSCU2:SC1_gp060:T-NOS	P-PAS2-1 P-PAS2-2 P-PAS2-3	
PAS3	T-NOS: <i>nptII</i> :P-NOS:P-35SCaMV:lam_678_GB:T-NOS	P-PAS3-8 P-PAS3-10	
MD26	T-NOS: <i>nptII</i> :P-NOS:P-AtSCU2:ED07_RS0204515:T-NOS	P-MD26-84	V-MD26-36 V-MD26-48 V-MD26-53 V-MD26-59 V-MD26-60 V-MD26-76
MD29	T-NOS: ED07_RS0204515:P-AtSUC2:T-NOS: <i>nptII</i> :P-NOS	P-MD29-04 P-MD29-07	V-MD29-02 V-MD29-03 V-MD29-07 V-MD29-08 V-MD29-10

Fonte: a autora

As plantas GM obtidas foram confirmadas pela amplificação via PCR dos transgenes de interesse, incluindo o gene de seleção *nptII* (Figuras 28, 29, 30 e 31).

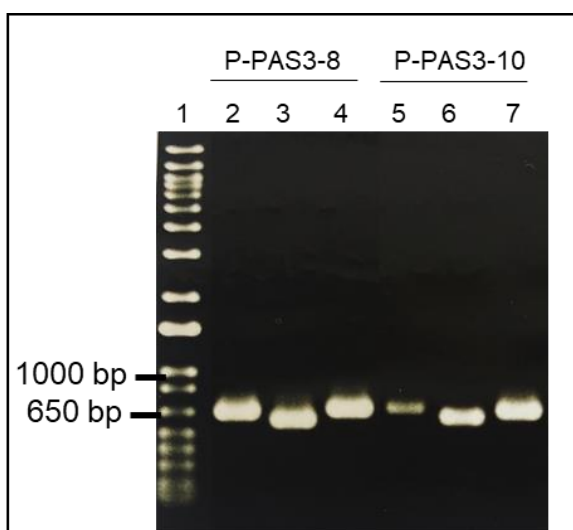
Figura 28. Perfil de amplificação via PCR utilizando DNA de extraído de folhas de laranja-doce transformada com PAS2.



As canaletas 2, 5 e 8 referem-se ao fragmento de 716 bp gerado pela amplificação da porção 5' do gene SC1_gp060; as canaletas 3, 6 e 9 referem-se ao fragmento de 597 bp gerado pela amplificação do gene da *nptII*; e as canaletas 4, 7 e 10 referem-se ao fragmento de 605 bp gerado pela amplificação da porção 3' do gene SC1_gp060 2PA. A canaleta 1 indica o marcador molecular 1 Kb plus (Thermo Fisher).

Fonte: a autora

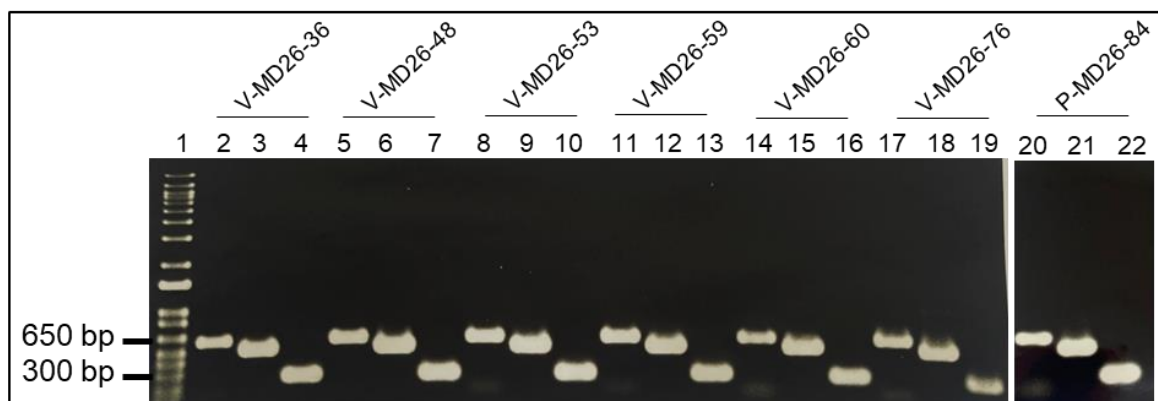
Figura 29. Perfil de amplificação via PCR utilizando DNA extraído de folhas de laranja-doce transformada com PAS3.



As canaletas 2 e 5 referem-se ao fragmento de 639 bp gerado pela amplificação da porção 5' do gene lam_678; as canaletas 3 e 6 referem-se ao fragmento de 597 bp gerado pela amplificação do gene da *nptII*; e as canaletas 4 e 7 referem-se ao fragmento de 655 bp gerado pela amplificação da porção 3' do gene lam_678. A canaleta 1 indica o marcador molecular 1 Kb plus (Thermo Fisher).

Fonte: a autora

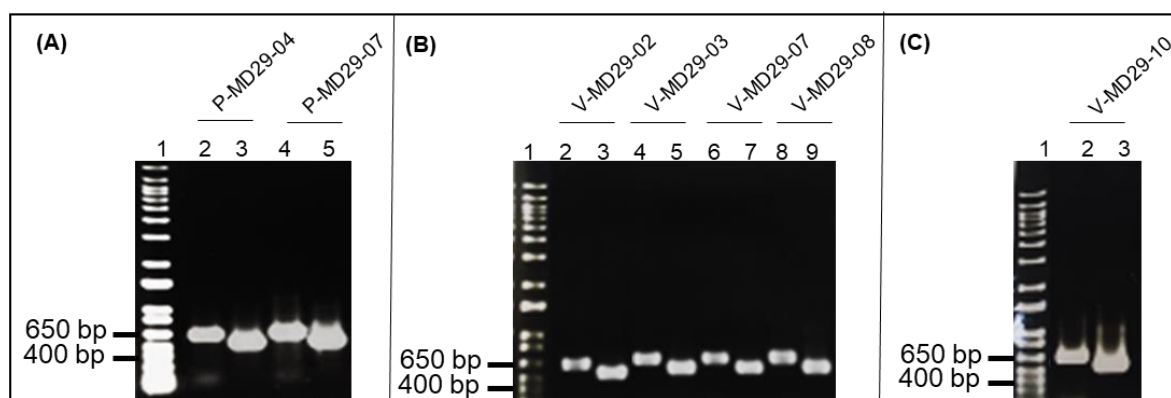
Figura 30. Perfil de amplificação via PCR utilizando DNA extraído de folhas de laranja-doce transformada com MD26.



As canaletas 2, 5, 8, 11, 14 e 17 e 20 referem-se ao fragmento de 575 bp gerado pela amplificação do gene *nptII*; as canaletas 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 referem-se ao fragmento de 493 bp gerado pela amplificação da região da junção do gene da lisozima ED07_RS0204515 e do gene do promotor *AtSUC2* e as canaletas 4, 7, 10, 13, 16, 19 e 22 referem-se ao fragmento de 297 bp gerado pela amplificação do gene da lisozima ED07_RS0204515. A canaleta 1 indica o marcador molecular 1 Kb plus (Invitrogen).

Fonte: a autora

Figura 31. Perfil de amplificação via PCR utilizando DNA extraído de folhas de laranja-doce transformada com MD29.



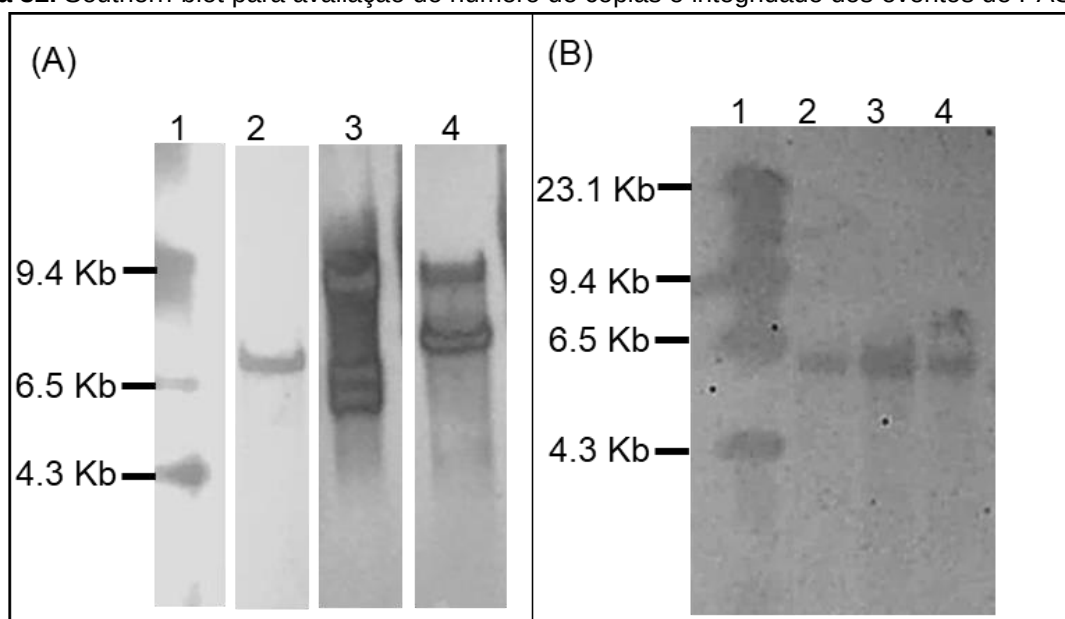
Em (A) as canaletas 2 e 4 referem-se ao fragmento de 575 bp gerado pela amplificação do gene *nptII* e as canaletas 3 e 5 referem-se ao fragmento de 493 bp gerado pela amplificação da região da junção do gene da lisozima ED07_RS0204515 e do gene do promotor *AtSUC2*. Em (B) as canaletas 2, 4, 6 e 8 referem-se ao fragmento de 575 bp e as canaletas 3, 5, 7 e 9 referem-se ao fragmento de 493 bp. Em (C) as canaletas 2 e 3 referem-se respectivamente aos fragmentos de 575 bp e 493 bp. A canaleta 1 indica o marcador molecular 1 Kb plus (Invitrogen).

Fonte: a autora.

4.4 Southern blot

De acordo com o resultado obtido na análise de Southern-blot, os eventos P-PAS2-1, P-PAS2-2 e P-PAS2-3 possuem 1, 3 e 2 cópias íntegras do gene SC1_gp060, respectivamente (Figura 32). Por outro lado, os eventos de MD26 apresentam apenas uma cópia íntegra do gene ED07_RS0204515 (Figura 33). A exceção é o evento P-MD26-84, que apresenta fragmento de clivagem marcado com sonda de tamanho maior do que o esperado na análise de integridade. Quanto ao número de cópias para esse evento, apesar de sete tentativas consecutivas para replicar o ensaio, nas quais tanto a quantidade de DNA na reação de clivagem quanto a quantidade de sonda em contato com a membrana foram incrementadas, e mesmo após a substituição de todas as soluções empregadas, somada à repetição da extração do DNA por três vezes, os resultados desejados não foram alcançados.

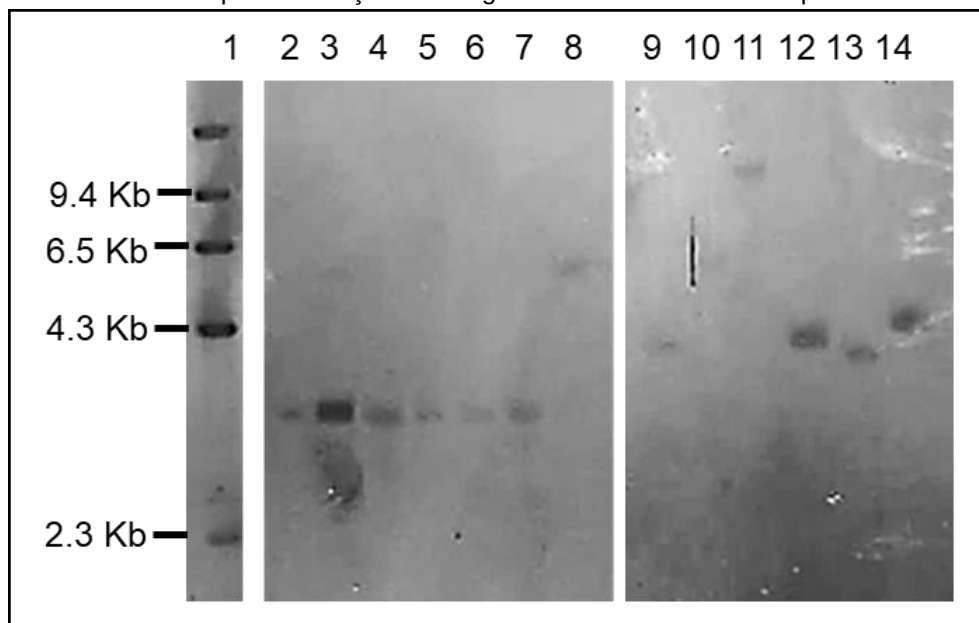
Figura 32. Southern-blot para avaliação do número de cópias e integridade dos eventos de PAS2.



Em (A) e (B) as canaletas 2, 3 e 4 indicam respectivamente o número de cópias e a integridade dos eventos P-PAS2-1, P-PAS2-2 e P-PAS2-3. A clivagem com as enzimas *RsrII* e *DraII* resulta em um fragmento de 6,2 kb. A canaleta 1 em (A) e (B) indica o marcador molecular DNA molecular weight marker II Dig-labeled (Roche). Foi utilizada sonda obtida com os primers NPTII-F/ NPTII_GB-R (ver Tabela 5).

Fonte: a autora

Figura 33. Southern-blot para avaliação de integridade e do número de cópias dos eventos de MD26.



As canaletas 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 indicam a integridade para os eventos V-MD26-36, V-MD26-48, V-MD26-53, V-MD26-59, V-MD26-60, V-MD26-76 e P-MD26-84 respectivamente. As canaletas 9, 10, 11, 12, 13 e 14 indicam o número de cópias para os mesmos eventos, com exceção de P-MD26-84. A clivagem com a enzima *Bam*HI resulta em um fragmento de 3,2 kb. A canaleta 1 indica o marcador molecular DNA molecular weight marker II Dig-labeled (Roche). Foi utilizada sonda obtida com os primers Lis_AtSUC2_F/ Lis_AtSUC2_R (ver Tabela 5).

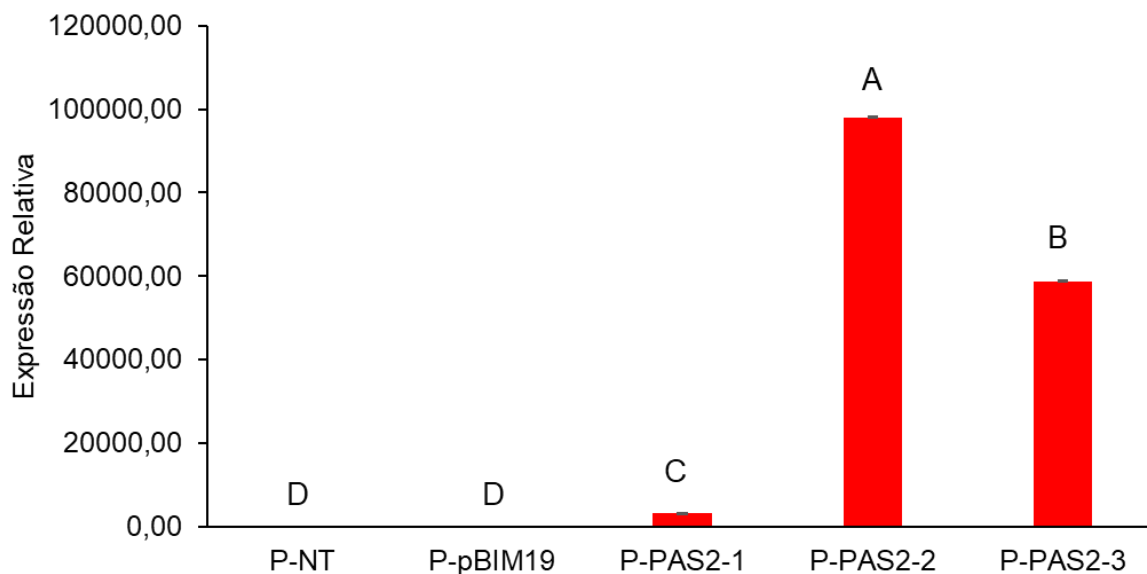
Fonte: a autora

A análise de Southern-blot não foi realizada para os eventos PAS3 e MD29, portanto os experimentos e análises subsequentes são concentrados nos eventos de PAS2 e MD26. Devido ao número limitado de eventos obtidos nas construções de interesse PAS2 e MD26, ainda que alguns apresentem múltiplas cópias integradas ao genoma, todos foram considerados nos experimentos a seguir.

4.5 Análise de expressão gênica relativa dos transgenes em laranjeiras-doces GM

Nas plantas matrizes dos eventos P-PAS2-1, P-PAS2-2 e P-PAS2-3, foi observada expressão significativa de SC1_gp060 sob o comando do promotor AtSUC2. Dentre os eventos, o P-PAS2-2 demonstrou nível mais elevado de expressão, com valor cerca de 2 vezes superior ao encontrado em P-PAS2-3 e aproximadamente 30 vezes superior ao encontrado em P-PAS2-1 (Figura 34). A análise foi repetida posteriormente após 2 anos e o mesmo resultado foi obtido.

Figura 34. Expressão gênica relativa do transgene SC1_gp060 nas matrizes dos eventos PAS2 em laranja-doce Pera.

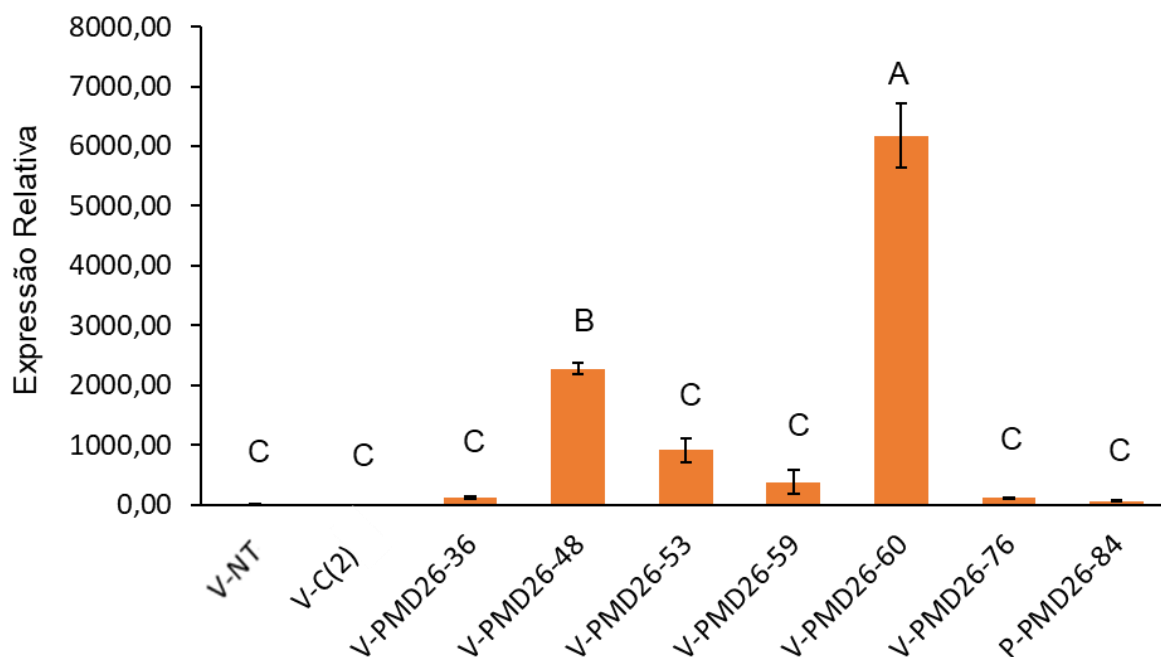


A planta do evento P-pBIM-19-11 (vetor vazio) e a planta P-NT (planta não transformada) foram utilizados como controles. As letras diferentes indicam que os eventos diferem estatisticamente entre si por Tukey, ($p \leq 0,05$). O gene SC1_gp060 2PA foi expresso 2 vezes e 30 vezes mais em P-PAS2-2 quando comparado respectivamente com P-PAS2-3 e P-PAS2-1.

Fonte: a autora

No contexto das matrizes dos eventos MD26, V-MD26-48, V-MD26-53, V-MD26-59 e V-MD26-60 destacam-se com os mais elevados níveis de expressão do transgene ED07_RS0204515, quando comparados aos controles. Notavelmente, V-PMD26-60 destacou-se ainda mais, apresentando uma expressão aproximadamente 3 vezes, 7 vezes e 16 vezes superior em relação a V-MD26-48, V-MD26-53 e V-MD26-59 (Figura 35). Por outro lado, embora os eventos V-MD26-36, V-MD26-76 e P-MD26-84 tenham exibido níveis de expressão, não houve diferença estatisticamente significativa em relação aos controles, conforme indicado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). A análise foi repetida após 7 meses em plantas propagadas a partir das matrizes e o mesmo resultado foi obtido.

Figura 35. Expressão gênica relativa do transgene ED07_RS0204515 nos eventos MD26 em laranja-doce Pera e Valencia.

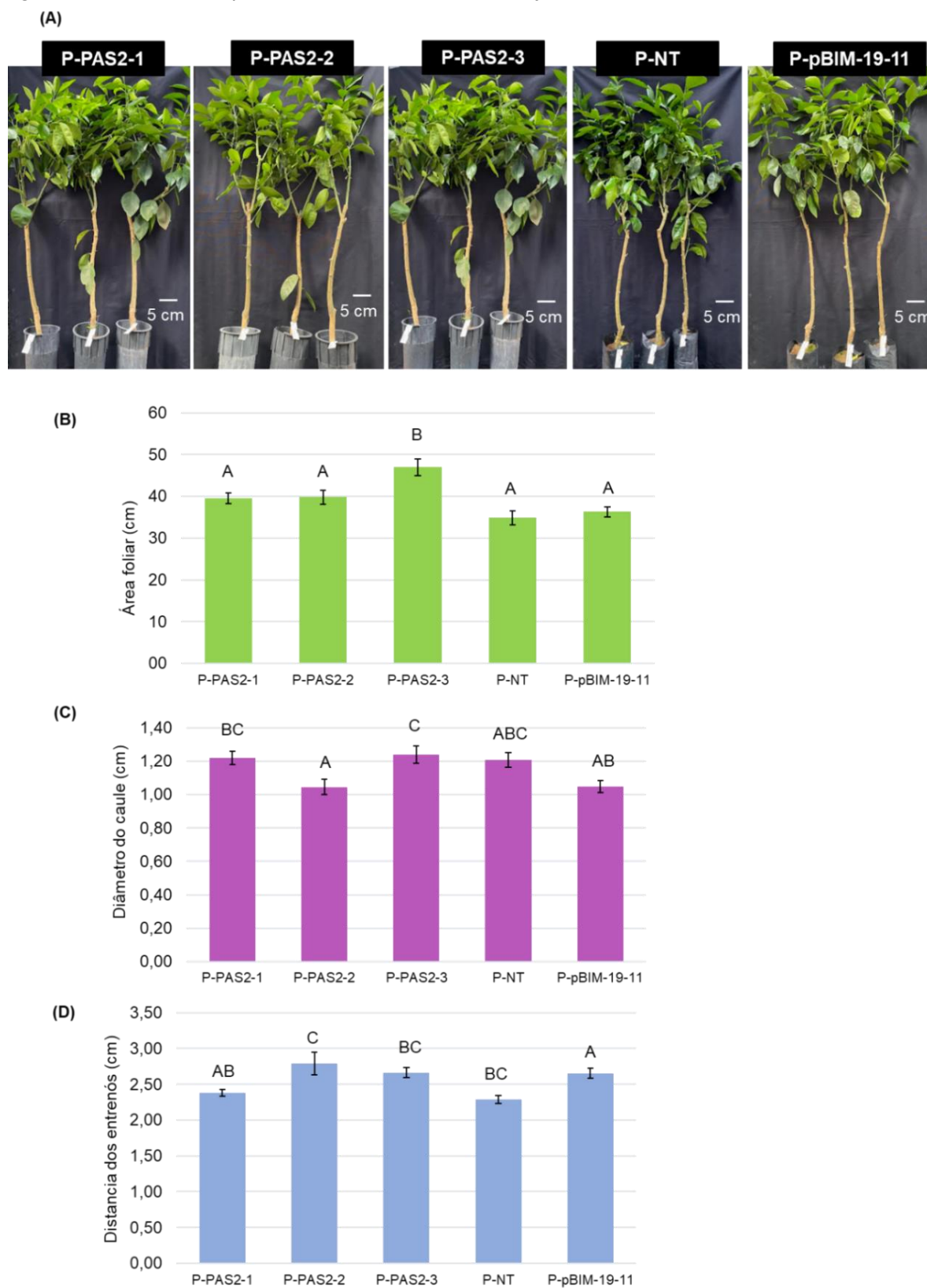


A planta do evento V-C(2) (vetor vazio) e a planta V-NT (planta não transformada) foram utilizados como controles. As letras diferentes indicam que os eventos diferem estatisticamente entre si por Tukey, ($p \leq 0,05$). O gene ED07_RS0204515 foi expresso 3, 7 e 16 vezes mais quando comparado respectivamente com V-MD26-48, V-MD26-53 e V-MD26-59.

Fonte: a autora

4.6 Análise fenotípica

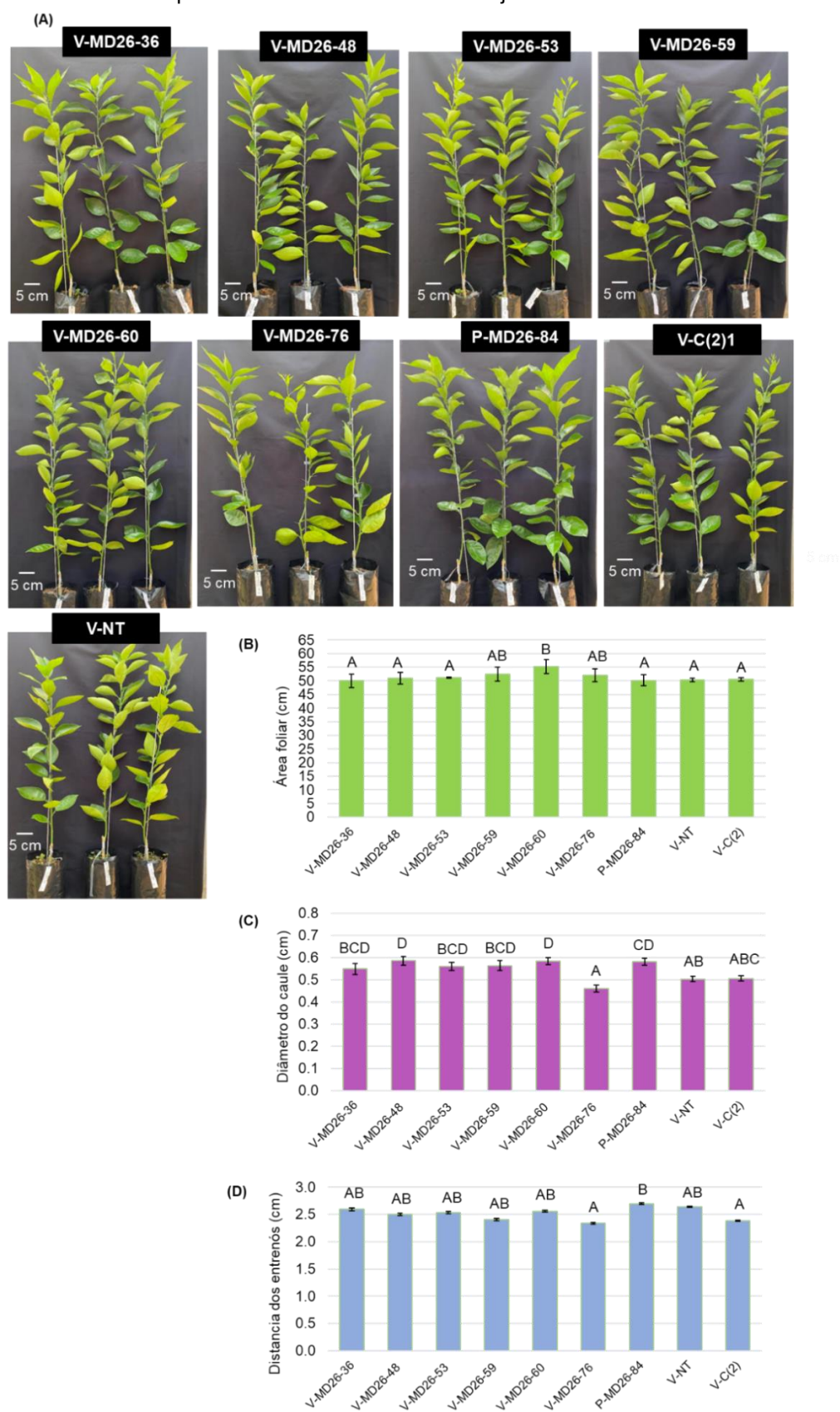
A avaliação fenotípica de laranjeiras-doces, das variedades 'Pera' e 'Valencia', nos eventos PAS2 (com 20 meses de idade) e MD26 (com 10 meses de idade), em comparação com seus controles correspondentes, indicou que as plantas modificadas não apresentaram diferenças discerníveis em sua fenologia quando comparadas às controle. Isso inclui características como tamanho, cor, formato das folhas e estrutura da copa, como evidenciado nas Figuras 36A e 37A. Em relação às métricas comparativas entre as plantas PAS2 e seus controles e as plantas MD26 e seus controles, os valores revelaram pequenas diferenças estatísticas, conforme apontado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) (Figura 36B, C e D; Figura 37B, C e D).

Figura 36. Análise fenotípica dos eventos PAS2 em laranjeiras-doces Pera.

Em (A), as plantas, com 20 meses de idade, são representadas por conjuntos de três. As letras distintas indicam que os eventos diferem estatisticamente entre si por Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: a autora

Figura 37. Análise fenotípica dos eventos MD26 em laranjeira doce Pera e Valencia.



Em (A), as plantas, com 10 meses de idade, são representadas por conjuntos de três. As letras distintas indicam que os eventos diferem estatisticamente entre si por Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: a autora

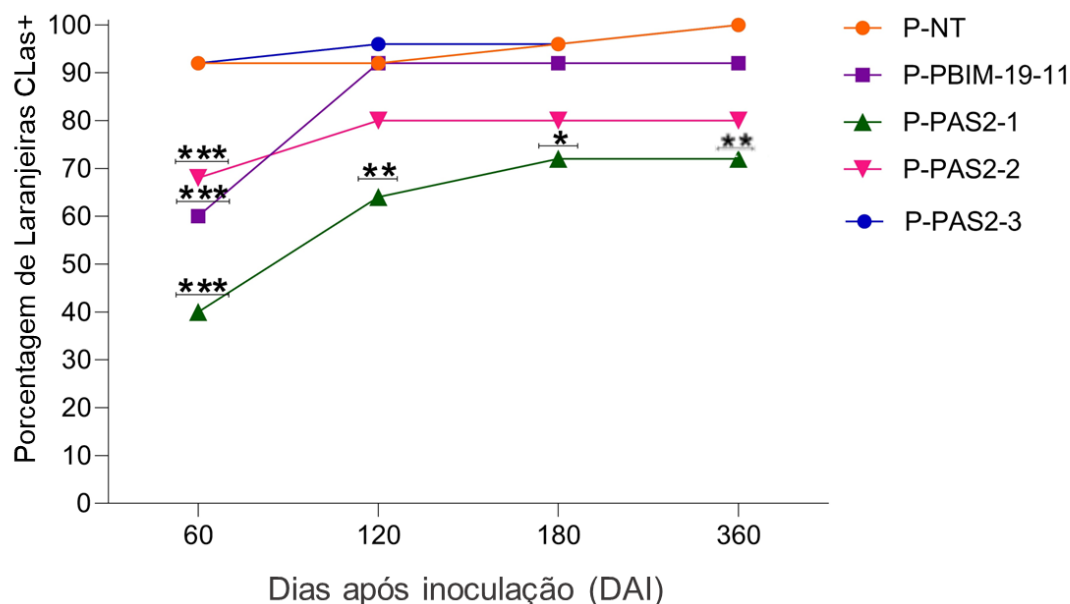
4.7 Laranjeiras-doces GM expressando SC1_gp060 inoculadas com CLas e CLam

4.7.1 Título bacteriano de CLas e porcentagem de plantas infectadas

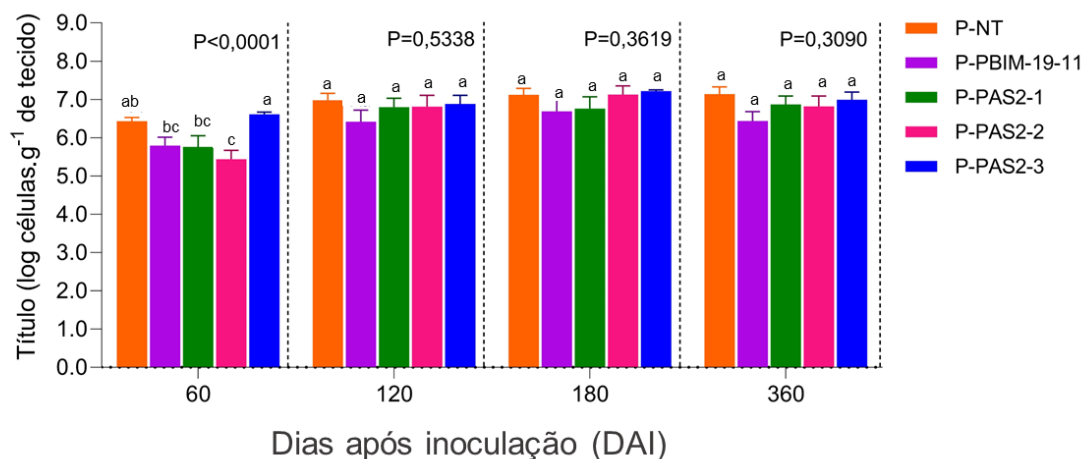
Dados relativos à detecção de CLas aos 60 DAI (dias após inoculação) indicam que para o evento P-PAS2-3 a frequência de plantas positivas para CLas foi similar ao grupo controle P-NT, não diferindo estatisticamente pelo teste χ^2 ($p \leq 0,05$) (Figura 38A). Entretanto, nos eventos P-PAS2-1 e P-PAS2-2, bem como P-pBIM-19-11, a frequência de detecção de CLas foi menor aos 60 DAI e houve diferença estatística em relação ao grupo controle. Nos demais períodos avaliados, com exceção a P-PAS2-1, os grupos P-PAS2-2, P-PAS2-3 e P-pBIM-19-11 não diferiram estatisticamente de P-NT na porcentagem de plantas infectadas com CLas. Quando avaliados os títulos médios de CLas nas plantas dos eventos P-PAS2-1 e P-PAS2-2, bem como P-pBIM-19-11, é possível observar que foram significativamente menores do que os observados nas plantas dos grupos P-PAS2-3 e P-NT aos 60 DAI. Nas demais amostragens realizadas, aos 120, 180 e 360 DAI os títulos médios bacterianos ($\log_{10}$ de células. g^{-1} de tecido) não diferiram estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$). Na comparação da evolução dos títulos médios de CLas nas amostragens periódicas, com exceção das plantas do evento P-pBIM-19-11, todos os grupos apresentam incremento significativo no título médio bacteriano, principalmente aos 360 DAI (Figura 38B).

Figura 38. Porcentagem de detecção **(A)** e títulos médios **(B)** de CLas nas propagações dos eventos P-PAS2-1, P-PAS2-2 e P-PAS2-3.

(A)



(B)



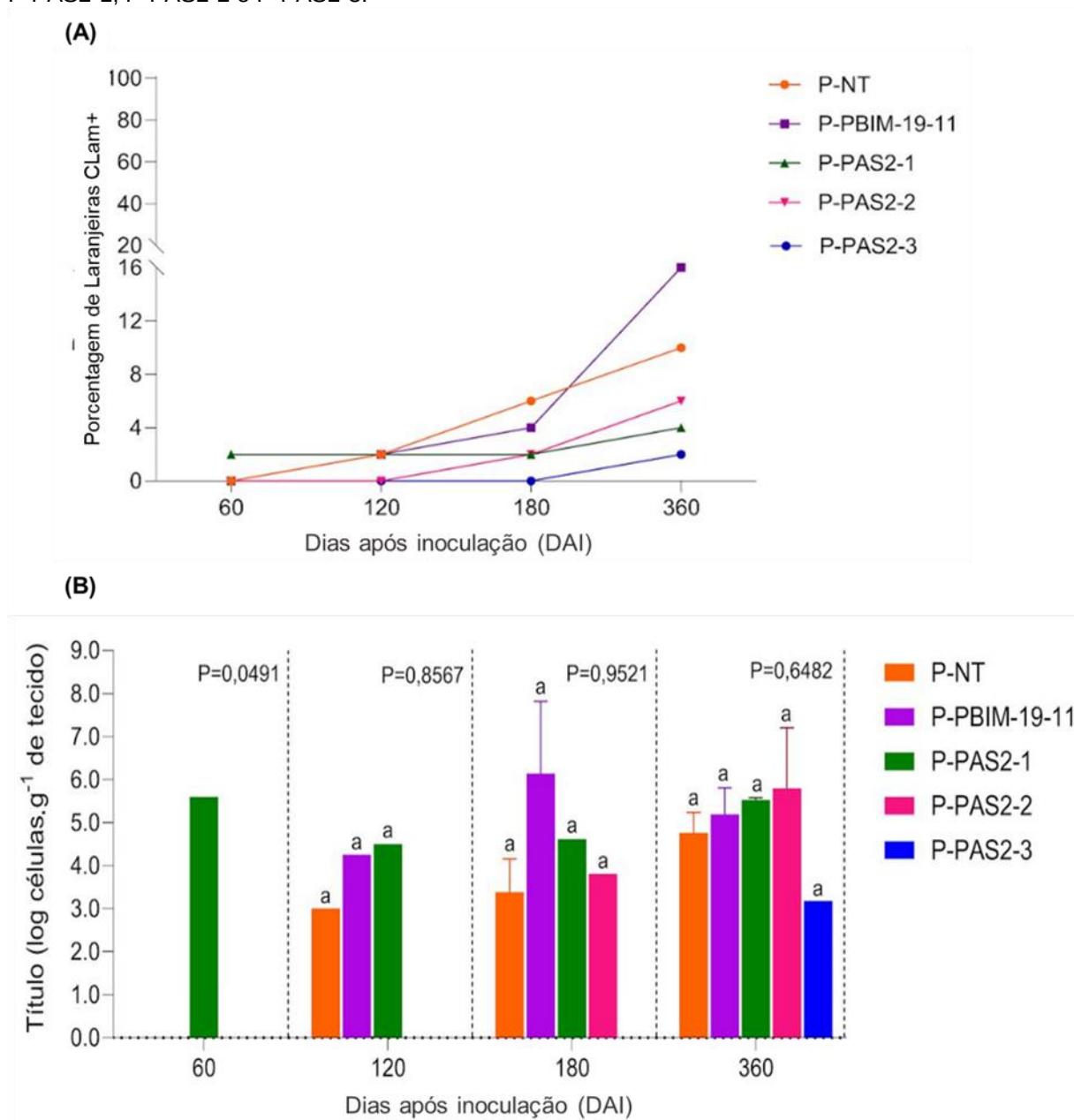
Plantas P-pBIM-19-11 e P-NT foram utilizadas como controle do vetor vazio e não transformado, respectivamente. Os dados são referentes às amostragens realizadas aos 60, 120, 180 e 360 dias após a inoculação/enxertia (DAI) de CLas. Em (A) Asteriscos (*) indicam diferença significativa entre os eventos e o grupo controle P-NT, pelo teste χ^2 a 0,05 (*), 0,005 (**) e 0,000 (***). Em (B) Letras minúsculas indicam diferença entre os grupos para uma mesma amostragem ou período avaliado por Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: a autora

4.7.2 Título bacteriano de CLam e porcentagem de plantas infectadas

Quanto à detecção de CLam nas plantas P-PAS2-1, P-PAS2-2, P-PAS2-3, assim como nos controles P-pBIM-19-11 e P-NT, apenas uma pequena porcentagem de plantas avaliadas apresentou presença desta bactéria: 4% de plantas P-PAS2-1, 6% de P-PAS2-2, 2% de P-PAS2-3, 16% de P-pBIM-19-11 e 10% de P-NT (Figura 39A). Observa-se uma menor frequência de plantas positivas para CLam nas construções PAS2, embora não haja diferença estatisticamente significativa quando as frequências são comparadas com os controles pelo teste χ^2 . Adicionalmente, foi observado um aumento nos níveis de título bacteriano a partir de 120 dias após a inoculação nas plantas avaliadas, sem diferença estatística por Tukey ($p \leq 0,05$) (Figura 39B).

Figura 39. Porcentagem de detecção (A) e títulos médios (B) de CLam nas propagações dos eventos P-PAS2-1, P-PAS2-2 e P-PAS2-3.



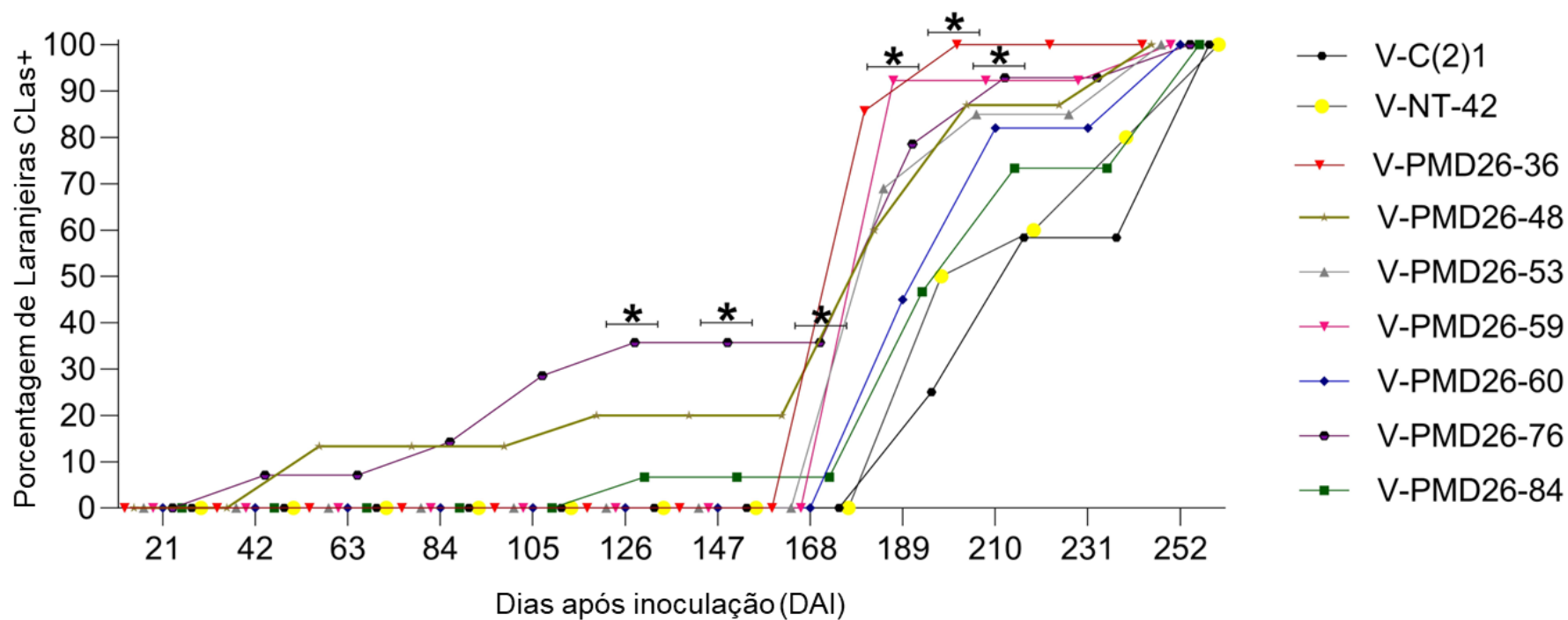
Plantas P-pBIM-19-11 e P-NT foram utilizadas como controle do vetor vazio e não transformado, respectivamente. Os dados são referentes às amostragens realizadas aos 60, 120, 180 e 360 dias após a inoculação/enxertia (DAI) de CLam. Em (A) não houve diferença estatística pelo teste χ^2 a 0,05. Em (B) Letras minúsculas indicam diferença entre os grupos para uma mesma amostragem ou período avaliado por Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: a autora

4.8 Laranjeiras-doces GM expressando ED07_RS0204515 inoculadas com CLas

Com base nos dados da experimentação com laranjeiras-doces MD26 desafiadas com CLas, observa-se que até 168 dias após a inoculação (DAI) apenas as plantas dos eventos V-MD26-48, V-MD26-76 e V-MD26-84 testaram positivas para CLas (Figura 40). As porcentagens de plantas positivas para esses eventos foram aproximadamente 40%, 20% e 10%, respectivamente. A partir de 168 DAI, todos os eventos apresentaram aumento nas porcentagens de plantas positivas, sendo que V-C(2) e V-NT exibiram as menores porcentagens até 252 DAI. É relevante ressaltar que diferenças estatísticas significativas, conforme evidenciadas pelo teste de qui-quadrado (χ^2) com um nível de significância (p) de 0,05, foram observadas apenas aos 126, 147 e 168 DAI para as plantas de V-MD26-76, aos 189 DAI para as plantas de V-MD26-59, e aos 210 DAI para as plantas de V-MD26-36, V-MD26-59 e V-MD26-76. No entanto, todas com níveis elevados de detecção de CLas em relação aos controles.

Figura 40. Porcentagem de detecção de CLas em eventos MD26.

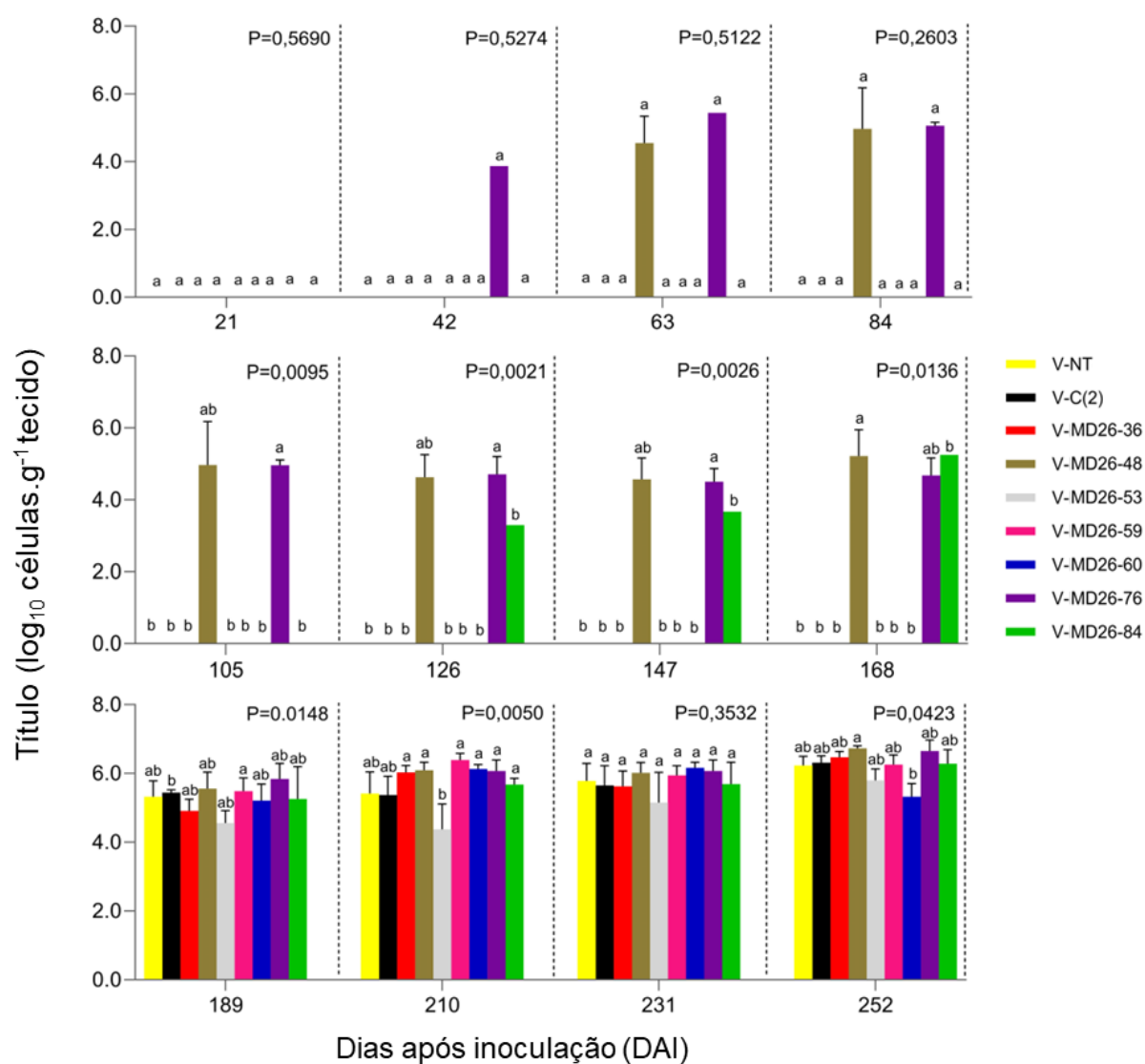


Plantas V-C(2) e V-NT foram utilizadas como controle do vetor vazio e não transformado, respectivamente. Os dados são referentes às amostragens realizadas a cada 21 dias durante 252 dias após a inoculação (DAI) de CLas. Asteriscos (*) indicam diferença significativa entre os eventos e o grupo controle V-NT, pelo teste χ^2 a 0,05 (*). A disposição da figura foi ajustada para a melhor visualização dos pontos.

Fonte: a autora

Ao avaliar os títulos médios (Figura 41) percebe-se que somente as plantas dos eventos V-MD26-48, V-MD26-76 e V-MD26-84 apresentaram título de CLas antes de 168 DAI. A partir de 189 DAI todas as plantas avaliadas, incluindo controles, apresentaram títulos bacterianos maiores que 4,5, com aumento expressivo até os 252 DAI.

Figura 41. Títulos médios de CLas nas propagações dos eventos MD26.



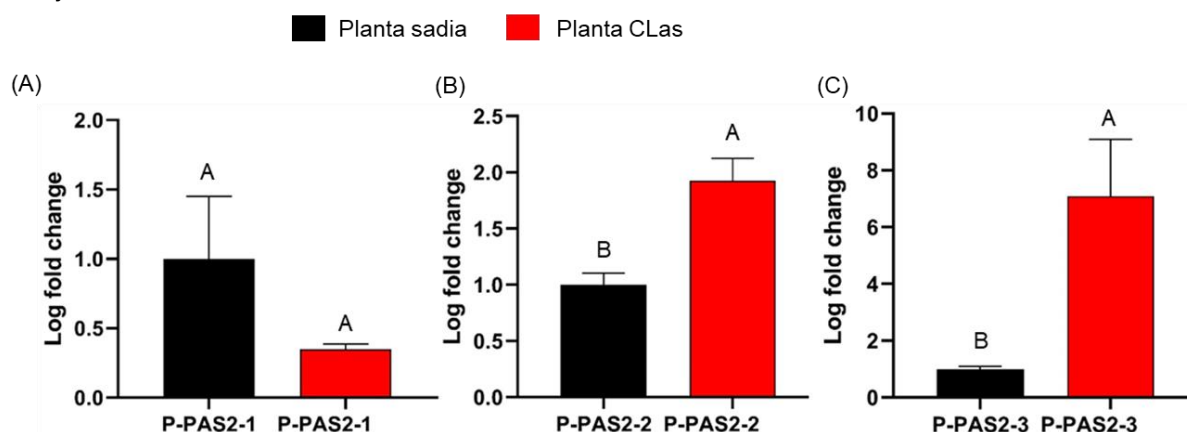
Letras minúsculas indicam diferença entre os grupos para uma mesma amostragem ou período avaliado por Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: a autora

4.9 Quantificação da expressão gênica de SC1_gp060 em eventos de laranjeiras-doces GM sob regulação do promotor *AtSUC2* em resposta a infecção por CLas

Os níveis de expressão do transgene SC1_gp060 foram avaliados em relação à presença ou ausência da bactéria nas propagações das plantas dos eventos P-PAS2-1, P-PAS2-2 e P-PAS2-3 aos 360 DAI. Nas plantas onde a presença de CLas foi detectada, verificou-se uma regulação positiva na expressão do transgene, controlado pelo promotor de floema *AtSUC2*, nos eventos P-PAS2-2 e P-PAS2-3. Em contrapartida, no evento P-PAS2-1, foi observada uma regulação negativa na expressão do transgene SC1_gp060 em plantas infectadas por CLas quando comparadas com aquelas não infectadas (sadias), conforme ilustrado na Figura 42.

Figura 42. Expressão relativa do transgene SC1_gp060 dirigido pelo promotor *AtSUC2* em plantas de laranja-doce dos eventos PAS2 infectadas com CLas e sadias.

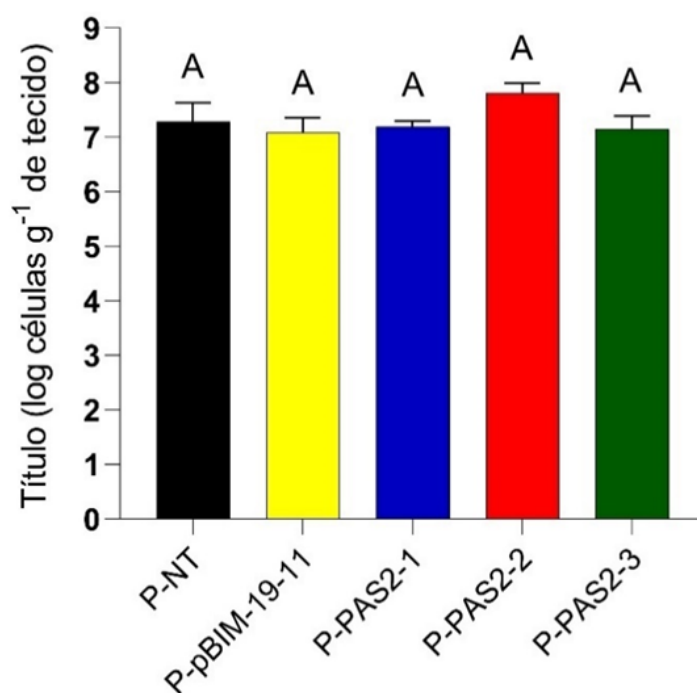


Em (A) (B) e (C) a expressão de SC1_gp060 CLas de plantas sadias estão representadas em preto e as infectadas com CLas em vermelho. Letras diferentes indicam que os eventos diferem estatisticamente entre si (Tukey, $p \leq 0,05$).

Fonte: a autora

Ao analisar o título bacteriano (Figura 43) no momento da coleta de amostras submetidas à análise de expressão, observa-se que todas as plantas possuem título bacteriano sem diferença estatística, portanto não há uma correlação direta entre os valores do título bacteriano e a expressão direcionada pelo promotor *AtSUC2* nos eventos.

Figura 43. Título de CLas nos eventos avaliados quanto a expressão gênica.



Letras iguais indicam que o título bacteriano dos diferentes eventos, não difere estatisticamente entre si (Tukey, $p \leq 0,05$).

Fonte: a autora

5 DISCUSSÃO

Mesmo após duas décadas de sua descoberta nas Américas e apesar dos avanços consideráveis e das informações substanciais adquiridas na investigação das interações no patossistema do HLB (MA et al., 2022; DAROLT et al., 2021), ainda existem desafios a serem vencidos. Neste cenário, o desenvolvimento de plantas GM superexpressando genes que sejam tóxicos ou que diminuam o *fitness* das bactérias fitopatogênicas que causam essa doença, surge como alternativa aos métodos de melhoramento genético clássicos (ÁLQUEZAR et al., 2021; PEÑA et al., 2008).

No âmbito deste estudo, foram desenvolvidas construções gênicas para a expressão dos genes SC1_gp060, lam_678 e ED07_RS0204515 em laranjeiras-doces. Os promotores escolhidos, *AtSUC2*, que dirige a expressão do gene transportador de sucrose ao floema *Arabidopsis thaliana*, e 35S do vírus do mosaico da couve-flor, têm sido amplamente empregados em diversos estudos em citros (BEZERRA et al., 2021; DUTT et al., 2012; ERPEN et al., 2018; MIYATA et al., 2017). A escolha do promotor *AtSUC2* se baseia no fato de as bactérias que causam o HLB colonizarem o floema de plantas cítricas. Desta maneira, a expressão direcionada além de permitir uma maior biodisponibilidade dos produtos de interesse, evita a expressão desnecessária em todos os tecidos da planta (BEZERRA et al., 2021). O método de clonagem utilizado, Golden Braid, é um sistema padronizado cujo mecanismo tem como base as enzimas de clivagem do tipo IIS *Bsal* e *Bsmbl* além de quatro plasmídeos (pDGBs) que funcionam em modelos de blocos (SARRION-PERDIGONES et al., 2011). Ao serem combinados através de reações simultâneas de clivagem e ligação, estes blocos permitem a montagem indefinida de diversos módulos gênicos ou unidades transcricionais que podem ser reutilizados em incontáveis construções (SARRION-PERDIGONES et al., 2011). Utilizando esse sistema de clonagem houve sucesso na inserção da região do T-DNA das construções via *A. tumefaciens* no genoma de laranjeiras-doces. Apesar disso, observou-se dificuldade de obtenção de eventos, particularmente para as construções PAS2 e PAS3 (respectivamente 3 e 2 eventos), estando esse resultado em contraste com a geração de eventos nas mesmas variedades para construções gênicas utilizando outros plasmídeos binários (SANTOS, 2019). Por esse motivo uma alternativa para esse sistema de clonagem foi utilizada, através da incorporação do cassete de ED07_RS0204515 obtido em vetor Golden Braid (MD26) ao vetor pROKII (MD29).

Foram gerados sete eventos em laranjeiras-doces provenientes de MD26 e oito provenientes de MD29. Neste trabalho, esse resultado evidencia que o tamanho do fragmento influencia também a eficiência da transformação e obtenção de eventos GM.

Análises de Southern-blot revelaram que os eventos de PAS2 obtidos, P-PAS2-1, P-PAS2-2 e P-PAS2-3, possuem 1, 3 e 2 cópias integras do transgene SC1_gp060 respectivamente, sendo que o maior nível de expressão foi observado no evento com o maior número de cópias. Em relação aos eventos de MD26, todos possuem uma única inserção integral do gene ED07_RS0204515 no genoma de laranjeira-doce, com exceção de V-MD26-84, que não foi possível obter o resultado quanto ao número de cópias. Como na integridade esse evento mostrou uma banda aproximadamente duas vezes maior que o esperado, há possibilidade de que tenha ocorrido uma dupla inserção *in tandem*. No entanto não foi possível observar bandas quando o DNA foi restringido com a enzima *HindIII*, apesar das inúmeras tentativas. Apesar do mesmo número de cópias, houve diferenças entre os níveis de expressão encontrados para os eventos de MD26. A variação nos níveis de expressão entre os eventos de uma mesma construção pode estar associada ao número de cópias inseridas durante a transformação ou ao local específico no genoma onde o gene foi integrado (SCHNELL et al., 2015). Alguns locais do genoma podem favorecer a integração e a expressão eficiente de genes, enquanto outros podem levar a uma expressão mais fraca ou instável. Isso ocorre devido à interação com elementos regulatórios naturais do genoma (SCHNELL et al., 2015). Ainda, um maior número de cópias de um gene inseridas no genoma pode levar a uma maior expressão do gene, mas isso não é linear. Pode haver um ponto em que a expressão atinge um platô ou até mesmo diminui. Em alguns casos, um número excessivo de cópias pode levar à co-supressão, um fenômeno no qual a planta reduz a expressão de todas as cópias do gene em vez de aumentá-la (SCHNELL et al., 2015). Silenciamento gênico em eventos da variedade 'Pera' foram observados onde o número de cópias foi elevado (SANTOS, 2019), sendo assim, o número de cópias é essencial no processo de seleção dos eventos, sendo preferíveis aqueles com 1 ou 2 cópias (LECHTENBERG et al., 2003). Contudo, neste trabalho, dado o baixo número de eventos obtidos para PAS2 optou-se por seguir a avaliação e desafio das três construções. Apesar das evidentes diferenças em relação ao número de cópias e aos níveis de expressão para eventos PAS2, fenotipicamente essas plantas se mostraram idênticas aos controles. O mesmo

foi observado para eventos MD26, evidenciando que não diferem de uma típica planta de laranjeira-doce.

Em plantas superexpressando SC1_gp060 no floema sob o comando do promotor *AtSUC2* e desafiadas pela inoculação via enxertia, não houve redução ou alterações significativas nos títulos bacterianos médios de CLas ou CLam. Os resultados foram observados em comparação aos tratamentos controle (plantas não transformadas e vetor vazio) até os 360 DAI. O mesmo foi constatado em laranjeiras-doce superexpressando ED07_RS0204515 até os 252 DAI. A investigação de bacteriocinas e lisozimas para o controle do HLB em sistema heterólogo explorada no Capítulo 2 do presente trabalho revelou que esses genes se configuravam como potenciais, alterando significativamente o desenvolvimento de *E. coli*, com redução média de 70% em relação ao controle utilizado. Em plantas GM, explorou-se possibilidade de que a superexpressão destes genes pudessem ter efeito tóxico também em CLas, mesmo no caso de SC1_gp060, onde a bactéria possui uma proteína de imunidade (SC2_gp255) na região dos profagos. A hipótese é que a superexpressão dos alvos pudesse saturar o sistema de proteção da bactéria, assim como aconteceu com a endolisina CMP1, que confere resistência a seu próprio hospedeiro *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em tomateiro GM (WITTMANN et al., 2016). Ainda assim, mesmo com a superexpressão dos genes de interesse, a indisponibilidade do antissoro para a realização de western-blot não permitiu a identificação do produto proteico produzido. Alguns trabalhos abordam a utilização de peptídeos, proteínas antibacterianas ou reguladores de resistência adquirida sistêmica em citrus contra as bactérias que causam o HLB, tendo resultados promissores (DUTT et al., 2015; ROBERTSON et al., 2018; XU et al., 2023; ZOU et al., 2017). Em seu trabalho, XU et al. (2023) obtiveram plantas de citrange ‘carrizo’ (*Citrus sinensis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) expressando as lisozimas CLIBASIA_04790 e CLIBASIA_04800 sob o comando do promotor 35S CaMV. Ao inocular essas plantas com CLas, evidenciaram que até 20 meses após a inoculação, haviam plantas com título de CLas de até 6,0 ($\log_{10}$ células. μg^{-1}) em tecido de raiz. No entanto, ao avaliar as folhas destas plantas aos 25 e aos 29 meses após inoculação, não constataram presença da bactéria em dois eventos avaliados. Esses resultados sugerem a possibilidade de que um período de avaliação mais prolongado seja necessário para determinar completamente a eficácia das proteínas produzidas em resposta ao CLas. Devido às limitações de tempo, neste trabalho, os experimentos 1

e 2 foram conduzidos por aproximadamente 360 dias (12 meses), enquanto que o 3 foi conduzido por aproximadamente 252 dias (8,5 meses). Por outro lado, foi evidenciado que aos 180 DAI em laranjeira-doce a população de CLas já está bem estabelecida (ALVES et al., 2021), sendo os períodos avaliados suficientes para demonstrar efetividade dos genes em estudo. Ainda, ZOU et al. (2017), ao avaliarem a expressão de uma cecropina B em floema de citros aos 24 meses após inoculação de CLas, não evidenciaram diferença estatística em relação aos títulos aos 18 meses após inoculação. Nesse estudo o gene sob o comando do promotor de tecido vascular GRP1.8 foi efetivo em inibir o crescimento da bactéria. A diferença nos resultados obtidos por XU et al. (2023) em relação ao presente trabalho pode ser atribuída, em parte, à escolha do promotor. DUTT et al. (2012) demonstraram que o promotor 35S é significativamente mais eficaz, exibindo uma eficiência de expressão 270% superior em comparação ao *AtSUC2*. No entanto, é importante ressaltar que esse aumento de eficiência vem acompanhado da desvantagem de uma expressão pronunciada em toda a planta, mesmo em áreas onde a presença da bactéria não é detectada. Além disso, a escolha do promotor pode ter implicações significativas na perspectiva da geração de uma planta comercialmente viável. O promotor 35S, embora demonstre uma eficiência expressiva, pode resultar em desperdício de recursos da planta e, potencialmente, impactar negativamente suas características agronômicas.

A menor proporção de plantas positivas e títulos médios para CLas no experimento 1 ocorreu em plantas do evento P-PAS2-1. Esses dados sugerem que esse evento teve maior efeito em impedir a colonização de CLas em relação aos demais eventos e controles avaliados, principalmente nos primeiros dias da interação planta-patógeno. No entanto, não se descarta a hipótese de que uma menor eficácia de transmissão da bactéria tenha ocorrido neste lote em específico. Assim como aconteceu no experimento 2 com CLam. Por outro lado, no experimento 3 possíveis falhas de inoculação foram corrigidas pela detecção de CLas próximo ao local da inoculação (casca do tronco). Um estudo conduzido por LOPES et al. (2009) apontou variações entre 54,7 e 88% na eficiência de transmissão de CLas por enxertia, mesmo método utilizado para a inoculação dos eventos estudados no presente trabalho. No mesmo trabalho é evidenciado também que os índices de eficiência na transmissão são ainda menores quando o inóculo é proveniente de plantas CLam, variando de 10,0 a 45,2%, dados esses que ajudam a explicar a baixa frequência de plantas positivas para CLam nas inoculações realizadas: as taxas de plantas confirmadas

positivas para a presença desta bactéria foi somente de até 16% (laranjeiras-doces do grupo controle P-pBIM-11-19), apesar da utilização de duas borbulhas. No experimento 3, foi evidenciado maiores porcentagens de plantas positivas para CLas nos eventos MD26 quando comparados com V-NT e V-C(2). Em relação aos títulos, apesar de aos 189 DAI algumas plantas do grupo GM MD26 estarem com títulos de CLas abaixo dos controles, nas amostragens seguintes esses valores oscilaram e ficaram bem próximos, com quase nenhuma diferença estatística. A exceção foi observada em V-MD26-60 na avaliação do título aos 252 DAI. Esse evento foi também o que mostrou maiores níveis de expressão do transgene quando comparado aos outros. Esses resultados sugerem uma dinâmica complexa na resposta das plantas MD26 à inoculação de CLas, destacando a importância de considerar múltiplos parâmetros ao avaliar a interação planta-patógeno.

Quando avaliados os níveis de expressão do transgene SC1_gp060 sob o comando do promotor de floema *AtSUC2* em função da presença ou ausência de CLas, observou-se que há uma maior expressão nas plantas dos eventos P-PAS2-2 e P-PAS2-3 quando a bactéria foi detectada. Esses dados corroboram com MIYATA et al. (2017) que evidenciaram a modulação positiva da expressão do gene repórter *uidA* sob o comando do promotor *AtSUC2* em plantas GM infectadas por CLas. Os autores fizeram uma correlação direta entre o título bacteriano e os níveis de expressão aumentadas do gene repórter em algumas laranjeiras-doces, sendo o aumento na expressão do gene alvo diretamente proporcional ao aumento do título bacteriano. Essa relação entre expressão gênica e presença de patógeno é consistente com trabalhos anteriores (EVRARD et al., 2007; HAHN, STRITTMATER, 1994; MALNOY et al., 2006; ZHENG et al., 2021). Em *A. thaliana* o promotor *AtSUC2* dirige a expressão de um importante gene, *SUC2*, envolvido no transporte de longa distância de sucrose (GOTTWALD et al., 2000). Em citros, BEZZERRA et.al. (2021) observaram que proteínas estruturais encontradas no floema, PP1 e PP2, com função semelhante à *SUC2* são induzidas na presença de CLas e CLam. Acredita-se que, de maneira geral, trata-se de uma resposta da planta à infecção, na tentativa de prevenir a perda de seiva pelas modificações e danos causados pela bactéria durante o processo de infecção e colonização (BEZERRA et al., 2021). Ao infectar tubos crivados do floema de laranja-doce, bactérias do gênero *Candidatus Liberibacter*, mesmo que tardiamente, estimulam uma série de respostas imunes, tais como indução de genes de defesa, produção espécies reativas do oxigênio (ROS) e

expressiva deposição de calose (MA et al., 2022). Como consequência da resposta imune da planta, o fluxo de foto-assimilados para o sistema radicular é severamente comprometido (BEZERRA et al., 2021; MA et al., 2022). Nesse sentido, para compensar, proteínas de floema responsáveis pelo transporte de açúcar tem sua regulação alterada em função das alterações que ocorrem na planta quando há colonização pela bactéria (ACHOR et al., 2020).

Apesar da ausência de efeitos observáveis até 252 DAI ou 360 DAI, é importante ressaltar que a inexistência de demonstrações visíveis não implica necessariamente em ineficácia. Os genes inseridos, podem desempenhar um papel crucial em termos de resistência a patógenos, mesmo que não tenham se manifestado de maneira evidente nos períodos de observação estabelecidos. A eficácia desses genes pode estar relacionada a mecanismos que podem ser acionados sob condições específicas de estresse ou em estágios posteriores de desenvolvimento da planta, como observado por XU et al. (2023). Além disso, a análise a longo prazo pode revelar impactos sutis ou acumulativos que não são imediatamente aparentes em períodos mais curtos. Portanto, embora a ausência de efeitos visíveis até o momento seja um aspecto relevante, é crucial considerar a possibilidade de que esses genes desempenhem um papel benéfico na resistência das plantas a CLas e CLam, mesmo que esse benefício não tenha se manifestado de maneira óbvia nas fases iniciais da observação. É importante considerar a singularidade de cada evento de plantas gerado, como observado em laranjeiras-doces nos trabalhos de SANTOS (2019) e XU et al. (2023). Adicionalmente, existe uma necessidade de comprovação da produção das proteínas resultantes dos genes estudados.

Os estudos de investigação, como o presente, são essenciais para descobrir genes letais contra as bactérias do HLB em citros, proporcionando perspectivas promissoras para o desenvolvimento de plantas resistentes. A compreensão da interação entre hospedeiros e patógenos é crucial para estratégias de controle eficazes. A identificação de genes antibacterianos e a pesquisa de promotores desempenham papéis fundamentais, permitindo otimizar a expressão gênica em termos de tempo e localização na planta. Essas descobertas são cruciais para enfrentar desafios agrícolas, como o HLB. Estudos como o presente são necessários para contribuir com ferramentas que asseguram a segurança alimentar e a sustentabilidade na produção de citros.

6 CONCLUSÕES

- Não foram identificadas diferenças significativas nos parâmetros fenotípicos entre as plantas MD26 ou PAS2 e os controles;
- Em eventos MD26 e PAS2 constatou-se expressão significativa de SC1_gp060 e ED07_RS0204515 respectivamente;
- Não houve diferença significativa no título de CLas ou CLam ou porcentagem de plantas infectadas ao comparar as plantas GM com os controles;
- O promotor *AtSUC2* sofre modulação positiva na presença de CLas;
- SC1_gp060 e ED07_RS0204515 são potenciais agentes antimicrobianos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHOR, D.; WELKER, S.; BEN-MAHMOUD, S.; WANG, C.; FOLIMONOVA, S. Y.; DUTT, M.; GOWDA, S.; LEVY, A. Dynamics of *Candidatus Liberibacter asiaticus* Movement and Sieve-Pore Plugging in Citrus Sink Cells. *Plant Physiology*, v. 182, n. 2, p. 882-891, fev. 2020
- ALQUÉZAR, B.; CARMONA, L.; BENNICI, S.; PEÑA, L. Engineering citrus to obtain huanglongbing resistance. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 7, p. 196-203, 2021
- ALQUÉZAR, B.; CARMONA, L.; BENNICI, S.; MIRANDA, M. P.; BASSANEZI, R. B.; PEÑA, L. Cultural Management of Huanglongbing: Current Status and Ongoing Research. *Phytopathology*, v. 112, n. 1, p. 11-25, 2022.
- ALVES, M. N.; LOPES, S. A.; RAIOL-JUNIOR, L. L.; WULFF, N. A.; GIRARDI, E. A.; OLLITRAULT, P.; PEÑA, L. Resistance to 'CLas,' the Huanglongbing Associated Bacterium, in Sexually and/or Graft-Compatible Citrus Relatives. *Frontiers in Plant Science*, v. 11, p. 617664, 2020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.617664>.
- BASSANEZI, R. B.; LOPES, S. A.; DE MIRANDA, M. P.; WULFF, N. A.; VOLPE, H. X. L.; AYRES, A. J. Overview of citrus huanglongbing spread and management strategies in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, v. 45, n. 3, p. 251–264, 2020.
- BEZERRA, Y. C. A.; MARQUES, J. P. R.; STIPP, L. C. L.; ATTÍLIO, L. B.; FREITAS-ASTÚA, J.; MOURÃO-FILHO, F. A. A. How to drive phloem gene expression? A case study with preferentially expressed citrus genes promoters. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal, v. 43, n. 4, 2021.
- BRASIL. Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados (OGM) e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS), reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança (PNB), revoga a Lei nº 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a Medida Provisória nº 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e os arts. 5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10º e 16º da Lei nº 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências. Brasília, DF, 24 de março de 2005. Disponível em: <<https://legislacao.presidencia.gov.br/atos/?tipo=LEI&numero=11105&ano=2005&ato=3fdUTWE5EMRpWT3a9>>. Acesso em: 05 de dez. 2023
- CIFUENTES-ARENAS, J. C. et al. Citrus flush shoot ontogeny modulates biotic potential of *Diaphorina citri*. *PloS ONE*, v. 13, n. 1, 2018.
- DAROLT, J. C.; BENTO, F. M. M.; MERLIN, B. L.; PEÑA, L.; CÔNSOLI, F. L.; WULFF, N. A. The Genome of "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" Is Highly Transcribed When Infecting the Gut of *Diaphorina citri*. *Front Microbiol*, 2021 Jul 12;12:687725.

- DUTT, M.; BARTHE, G.; IREY, M.; GROSSER, J. Transgenic citrus expressing an Arabidopsis RPR1 gene exhibit enhanced resistance against Huanglongbing (HLB; Citrus Greening). *PLOS ONE*, v. 10, n. 9, 2015.
- ERPEN, L.; TAVANO, E. C. R.; HARAKAVA, R.; DUTT, M.; GROSSER, J. W.; PIEDADE, S. M. S.; MENDES, B. M. J.; MOURÃO FILHO, F. A. A. Isolamento, caracterização e avaliação de três promotores gênicos constitutivos derivados de *Citrus sinensis*. *Plant Cell Rep.*, v. 37, n. 8, p. 1113-1125, ago. 2018.
- EVARD, A.; MEYNARD, D.; GUIDERDONI, E.; JOUDRIER, P.; GAUTIER, M. F. The promoter of the wheat puroindoline-a gene (PinA) exhibits a more complex pattern of activity than that of the PinB gene and is induced by wounding and pathogen attack in rice. *Planta*, v. 225, n. 2, p. 287-300, jan. 2007.
- FOLIMONOVA, S. Y.; ROBERTSON, C. J.; GAMSEY, S. M.; DAWSON, W. O. Examination of the responses of different genotypes of citrus to huanglongbing (citrus greening) under different conditions. *Phytopathology*, v. 23, p. 1346–1354, 2009. doi: 10.1094/PHYTO-99-12-1346.
- GOTTWALD, J. R.; KRYSAN, P. J.; YOUNG, J. C.; EVERT, R. F.; SUSSMAN, M. R. Genetic evidence for the in plant role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 97, p. 13979–13984, 2000.
- HAHN, K.; STRITTMATTER, G. Pathogendefense gene prp11 from potato encodes an auxinresponsive glutathione Stransferase. *Eur. J. Biochem.*, v. 226, p. 619–626, 1994.
- HUANG, C.; ARAUJO, C.; SÁNCHEZ, J. N.; KUND, G.; TRUMBLE, J.; ROPER, C.; GODFREY, K. E.; JIN, H. A stable antimicrobial peptide with dual functions of treating and preventing citrus Huanglongbing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 118, n. 6, 2021.
- JIA, H.; XU, J. ORBOVIĆ, V.; ZHANG, Y.; WANG, N. Editing citrus genome via SaCas9/sgRNA system. *Front. Plant Sci.*, v. 8, p. 2135, 2017a.
- JIA, H.; ZHANG, Y.; ORBOVIĆ, V.; XU, J.; WHITE, F. F.; JONES, J. B., et al. Genome editing of the disease susceptibility gene CsLOB1 in citrus confers resistance to citrus canker. *Plant Biotechnol. J.*, v. 15, p. 817–823, 2017b.
- KISHOR, P. B. K.; RAJAM, M. V.; PULLAIAH, T. Genetic Tinkering of Crops for Sustainable Development: 2020 and Beyond. In: KAVI KISHOR, P. B.; RAJAM, M. V.; PULLAIAH, T. (eds) *Genetically Modified Crops*. Springer, Singapore, 2021.
- KOBAYASHI, A.; BESPALHOK, J.; PEREIRA, L. et al. Plant regeneration of sweet orange (*Citrus sinensis*) from thin sections of mature stem segments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 74, p. 99–102, 2003.
- LACORTE, C.; ROMANO, E. Transferência de vetores para *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Ed.). *Manual de transformação*

- genética de plantas. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. Cap. 6, p. 103-104.
- LECHTENBERG, B.; SCHUBERT, D.; FORSBACH, A.; GILS, M.; SCHMIDT, R. Neither inverted repeat T-DNA configurations nor arrangements of tandemly repeated transgenes are sufficient to trigger transgene silencing. *Plant J.*, v. 34, p. 507–517, 2003.
- LI, W.; HARTUNG, J. S.; LEVY, L. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus* Liberibacter species associated with citrus huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods*, v. 66, p. 104–115, 2006.
- LIU, Y.; HEYING, E.; TANUMIHARDJO, S. A. History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 11, p. 530–545, 2012. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2012.00201.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. H. Commercially-Feasible Micropropagation of Mountain Laurel (*Kalmia latifolia*) by Use of Shoot-Tip Culture. *Combined Proceedings-International Plant Propagator's Society*, v. 30, p. 421-427, 1980.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *METHODS*, v. 25, p. 402–408, 2001.
- LOPES, A. S.; 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. *Phytopathol.*, v. 99, p. 301-306, 2009
- LOPES AS, FRARE GF. 2008. Graft Transmission and Cultivar Reaction of Citrus to '*Candidatus* Liberibacter americanus'. *Plant Disease*, 92: 21-24.
- MA, G.; ZHANG, L.; SUGIURA, M.; KATO, M. "Citrus and health." In: TALON, M.; CARUSO, M.; GMITTER, F. G. (Eds.). *The Genus Citrus*, 1st edition. Cambridge, UK: Elsevier, 2020, p. 495-511.
- MAFRA, V.; Kubo, K. S.; Alves-Ferreira, M.; Ribeiro-Alves, M.; Stuart, R. M.; Boava, L. P.; Rodrigues, C. M.; Machado, M. A. Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. *PLoS ONE*, v. 7, n. 2, 2012.
- MALNOY, M.; REYNOIRD, J.P.; BOREJSZA-WYSOCKA, E.E.; ALDWINCKLE, H.S. Activation of the pathogeninducible *gst1* promoter of potato after elicitation by *Venturia inaequalis* and *Erwinia amylovora* in transgenic apple (*Malus domestica*). *Transgenic Res.*, v. 15, pp. 83–93, 2006.
- MARTINS, Elaine Cristina. Caracterização biológica de um clone infeccioso do Citrus tristeza virus (CTV) de origem brasileira, utilização do vetor viral CTV para o controle de *Candidatus* Liberibacter asiaticus e método multiplex de detecção das bactérias associadas ao Huanglongbing. 2023. Tese (Doutorado em

- Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, 199 f.
- MCGARVEY, P. B.; KAPER, J. M. A simple and rapid method for screening transgenic plants using the PCR. *Biotechniques*, v. 11, p. 428–432, 1991.
- MIYATA, L. Y.; HARAKAVA, R.; STIPP, L. C. L.; MENDES, B. M. J.; APPEZZATO-DAGLÓRIA, B.; MOURÃO FILHO, F. A. A. GUS expression in sweet oranges (*Citrus sinensis* L. Osbeck) driven by three different phloem-specific promoters. *Plant Cell Report*, Berlin, v. 31, n. 11, p. 2005-2013, 2012.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, v. 15, p. 473–479, 1962.
- MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, v. 8, p. 4321-5, 1980.
- PEÑA, L.; CERVERA, M.; FAGOAGA, C.; ROMERO, J.; BALLESTER, A.; SOLER, N.; PONS, E.; RODRIGUEZ, A.; PERIS, J.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, L. Citrus. In: KOLE, C.; HALL, T. C. (Org.) *Compendium of transgenic crop plants: transgenic tropical and subtropical fruits and nuts*. Oxford; Wiley-Blackwell, 2008. v. 5, p. 1-62.
- ROBERTSON, C.; ZHANG, X.; GOWDA, S.; ORBOVIĆ, V.; DAWSON, W.; MOU, Z. Overexpression of the Arabidopsis NPR1 protein in citrus confers tolerance to Huanglongbing. *Journal of Citrus Pathology*, v. 5, n. 1, 2018.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
- SANTOS, Mateus de Almeida. *Produção e emissão de β -cariofileno em laranjeiras e *Arabidopsis thaliana* pela superexpressão de terpeno sintases e avaliação da expressão gênica nas vias biossintéticas para produção de terpenos*. 2019. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, 136 f.
- SARRION-PERDIGONES, A.; FALCONI, E. E.; ZANDALINAS, S. I.; JUÁREZ, P.; FERNÁNDEZ-DEL-CARMEN, A.; GRANELL, A.; ORZAÉZ, D. GoldenBraid: An iterative cloning system for standardized assembly. *PLoS ONE*, v. 6, n. 7, 2011.
- SCHNELL, J.; STEELE, M.; BEAN, J.; NEUSPIEL, M.; GIRARD, C.; DORMANN, N.; PEARSON, C.; SAVOIE, A.; BOURBONNIÈRE, L.; MACDONALD, P. A comparative analysis of insertional effects in genetically engineered plants: considerations for pre-market assessments. *Transgenic Research*, [S.l.], v. 24, n. 1, p. 1-17, fev. 2015.
- SINGER, S. D.; HILY, J. M.; COX, K. D. The sucrose synthase-1 promoter from *Citrus sinensis* directs expression of the β -glucuronidase reporter gene in phloem tissue and in response to wounding in transgenic plants. v. 234, p. 623–637, 2011.

- SUN, L.; NASRULLAH; KE, F.; NIE, Z.; WANG, P.; XU, J. Citrus Genetic Engineering for Disease Resistance: Past, Present and Future. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 21, p. 5256, 2019.
- USDA/FAS - FOREIGN AGRICULTURAL SERVICES. Citrus: World Markets and Trade. July 2023. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>. Acesso em: 02 de dezembro de 2023
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Agricultural Biotechnology Annual: Brazil. Brasília: Post Brasília, 27 de dezembro de 2022. Disponível em: https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Agricultural%20Biotechnology%20Annual_Brasilia_Brazil_BR2022-0064.pdf. Acesso em: 09 de dezembro de 2023
- TAVANO, E. C. R.; ERPEN, L.; ALUISI, B.; HARAKAVA, R.; LOPES, J. R. S.; VIEIRA, M. L. C.; PIEDADE, S. M. S.; MENDES, B. M. J.; MOURÃO-FILHO, F. A. A. Sweet orange genetic transformation with the attacin A gene under the control of phloem-specific promoters and inoculation with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, v. 94, n. 2, p. 210-219, 2019.
- TEIXEIRA, D. C.; SAILLARD, C.; EVEILLARD, S.; DANET, J. L.; COSTA, P. I.; AYRES, A. J.; BOVÉ, J. "*Candidatus Liberibacter americanus*", associated with citrus huanglongbing (greening disease) in Sao Paulo State, Brazil. *Int. J. Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 55, p. 1857–1862, 2005.
- TRIJATMIKO, K. R. et al. Molecular Analyses of Transgenic Plants. In: MACDONALD, J.; KOLOTILIN, I.; MENASSA, R. (Eds.). *Recombinant Proteins from Plants. Methods in Molecular Biology*, v. 1385. Human Press, New York, NY, 2016.
- WANG, Nian. A Promising Plant Defense Peptide Against Citrus Huanglongbing Disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 118, n. 6, 2021. DOI: 10.1073/pnas.2026483118.
- WITTMANN, J.; BRANCATO, C.; BERENDZEN, K. W. et al. Development of a tomato plant resistant to *Clavibacter michiganensis* using the endolysin gene from bacteriophage CMP1 as a transgene. *Plant Pathology*, v. 65, p. 496–502, 2016.
- XU, L.; MO, K.; RAN, D.; MA, J.; ZHANG, L.; SUN, Y.; LONG, Q.; JIANG, G.; ZHAO, X.; ZOU, X. An endolysin gene from *Candidatus Liberibacter asiaticus* confers dual resistance to huanglongbing and citrus canker. *Hortic Res.*, v. 10, n. 9, 2023.
- ZHENG, E.; WANG, X.; XU, R.; YU, F.; ZHENG, C.; YANG, Y.; CHEN, Y.; CHEN, J.; YAN, C.; ZHOU, J. Regulation of OsPR10a Promoter Activity by Phytohormone and Pathogen Stimulation in Rice. *Rice Science*, v. 28, n. 5, p. 442-456, 2021.
- ZOU, X.; JIANG, X.; XU, L.; LEI, T.; PENG, A.; HE, Y.; CHEN, S. Transgenic citrus expressing synthesized cecropin B genes in the phloem exhibits decreased susceptibility to Huanglongbing. *Plant Molecular Biology*, v. 93, n. 4–5, 2017, p. 341-353.

CAPÍTULO 4

GENOMA COMPLETO DO ISOLADO 9PA DE '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS PREVALENTES NA CITRICULTURA BRASILEIRA

RESUMO

'*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (CLas) é uma α -proteobactéria restrita ao floema e não cultivável associada ao Huanglongbing (HLB) dos citros, uma doença severa com implicações globais, afetando especialmente a produção de laranjas no Brasil. Este estudo se concentra em relatar o genoma completo do primeiro isolado brasileiro de CLas, nomeado de 9PA. No genoma de 9PA foram identificados dois profagos, P-9PA-1 e P-9PA-3. P-9PA-1 foi encontrado tanto integrado quanto circular, enquanto P-9PA-3 ocorre exclusivamente em forma circular. Notavelmente, esses profagos exibem alta identidade com seus homólogos, os profagos tipos 1 (83%) e 3 (98%) (SC1 e P-JXGC-3). A comparação do genoma de 9PA com outros 13 genomas completos revelou 9.091 *mismatches* e 992 gaps/inserções, destacando oito blocos localmente colineares. Dentre esses, seis, particularmente divergentes, estão localizados na região do profago e dois, compreendendo 97% da comparação, revelam regiões desse patógeno com alta sintenia. A árvore filogenética, baseada na comparação de genomas completos, categorizou os 14 genomas de CLas em dois grupos principais, sendo 9PA parte de um grupo representado principalmente por isolados da China e dos EUA. Além disso, a partir de comparação de genomas completos e uma minuciosa seleção, identificamos seis regiões genômicas hipervariáveis (*Hiper Variable Genomic Regions* - HGRs), incluindo três na região do profago e três na região do cromossomo. Essas HGRs foram utilizadas para avaliar 68 amostras de isolados provenientes de áreas com média e alta incidência de HLB no estado de São Paulo. A análise revelou que 9PA faz parte do segundo grupo mais prevalente (perfil A), representando 20,6% das amostras, enquanto o grupo mais prevalente (perfil B) compreende 41,2%. O perfil C representou 10,3%, e os 27,9% restantes englobaram 13 perfis distintos (D a P). Três HGRs, nomeadamente HGR_4, HGR_6 e HGR_7, podem ser empregadas para determinar a ocorrência de profagos em isolados de CLas através da análise dos produtos e PCR. Por outro lado, HGR_M representa uma região que abrange um *Microviridae* recentemente descrito nos genomas de CLas. A obtenção do genoma completo de CLas 9PA, a caracterização de seus profagos e a identificação de HGRs na população do Brasil pode fornecer insights sobre as interações de CLas com elementos de profagos, aparecimento de sintomas, processos evolutivos e adaptação a hospedeiros.

Palavras-chave: genoma completo, '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', profagos, caracterização molecular, regiões genômicas hipervariáveis

**THE COMPLETE GENOME OF ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ STRAIN 9PA
AND THE MOLECULAR CHARACTERIZATION OF
THE PREVALENT STRAINS IN THE BRAZILIAN CITRICULTURE**

ABSTRACT

‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ (CLas) is an α -proteobacterium restricted to the phloem and non-culturable, associated with Citrus Huanglongbing (HLB), a severe disease with global implications, especially affecting orange production in Brazil. This study focuses on reporting the complete genome of the first Brazilian isolate of CLas, named 9PA. In the 9PA genome, two prophages, P-9PA-1 and P-9PA-3, were identified. P-9PA-1 was found both integrated and circular, while P-9PA-3 occurs exclusively in circular form. Remarkably, these prophages exhibit high identity with their counterparts, prophage types 1 (83%) and 3 (98%) (SC1 and P-JXGC-3). Genome comparison between 9PA and 13 other complete genomes revealed 9,091 mismatches and 992 gaps/insertions, highlighting eight locally collinear blocks. Among these, six, particularly divergent, are in the prophage region, and two, comprising 97% of the comparison, reveal regions of this pathogen with high synteny. The phylogenetic tree, based on whole genome comparisons, categorized the 14 CLas genomes into two main groups, with 9PA being part of a group represented mainly by isolates from China and the USA. Furthermore, through whole genome comparisons and careful selection, we identified six Hypervariable Genomic Regions (HGRs), including three in the prophage region and three in the chromosome region. These HGRs were used to assess 68 samples of isolates from areas with medium and high HLB incidence in the state of São Paulo. The analysis revealed that 9PA is part of the second most prevalent group (profile A), representing 20.6% of the samples, while the most prevalent group (profile B) comprises 41.2%. Profile C represented 10.3%, and the remaining 27.9% encompassed 13 distinct profiles (D to P). Three HGRs, namely HGR_4, HGR_6, and HGR_7, can be used to determine the occurrence of prophages in CLas isolates through PCR product analysis. On the other hand, HGR_M represents a region that encompasses a *Microviridae* recently described in CLas genomes. The acquisition of the complete genome of CLas 9PA, the characterization of its prophages, and the identification of HGRs in the Brazilian population can provide insights into the interactions of CLas with prophage elements, symptom appearance, evolutionary processes, and host adaptation.

Key Words: complete genome, ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*,’ prophages, molecular characterization, hypervariable genomic regions

1 INTRODUÇÃO

O Huanglongbing (HLB é uma doença dos citros globalmente emergente e altamente destrutiva (BASSANEZI et al., 2020; BOVÉ, 2006). Atribuída a três espécies de α -proteobactérias não cultiváveis do gênero '*Candidatus Liberibacter*': '*Ca. Liberibacter asiaticus*' (CLas), '*Ca. Liberibacter americanus* (CLam) e '*Ca. Liberibacter africanus*' (CLas) (BOVÉ, 2006; JAGOUÉIX et al., 1994; TEIXEIRA et al., 2005), o HLB tem sido uma preocupação para a indústria citrícola desde sua descoberta na China no final do século XIX (REINKING, 1919). Entre as bactérias, CLas tem recebido atenção especial devido à sua prevalência global e aos extensos danos que causa em pomares de citros. No Brasil, CLas permanece como o principal patógeno, infectando aproximadamente 99,9% das árvores afetadas pelo HLB, enquanto CLam não é mais detectado (BASSANEZI et al., 2020).

A incapacidade de cultivo de CLas, assim como outras Liberibactérias, com exceção de Lcr, tem apresentado desafios únicos, exigindo o uso de técnicas de PCR/sequenciamento para investigar sua diversidade genética. Um marco na pesquisa sobre o HLB foi a publicação do primeiro genoma de CLas por DUAN et al. (2009), possibilitando uma exploração abrangente da estrutura genômica desta bactéria, além de análises de genomas completos, levando à identificação de profagos (ZHANG et al., 2011) e genes-chave envolvidos em interações com o hospedeiro (CHEN et al., 2020; de PAULA et al., 2019; DOMINGUEZ-MIRAZO et al., 2019; DU et al., 2023; FLEITES et al., 2014; JAIN et al., 2015; LIU et al., 2019; SHEN et al., 2022; THAPA et al., 2020; ZHENG et al., 2018).

Os genomas de CLas são relativamente pequenos (~ 1.2 Mpb) e consistem em uma região cromossômica altamente conservada e uma região de profagos variável. Estudos anteriores que investigaram as variações genéticas de CLas tiveram foco principalmente em RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, SNPs (*Single-Nucleotide Polymorphism*) e *indels* em regiões específicas, como no RNA ribossomal 16S/23S (rRNA), no gene deoxyribonucleotide reductase (*nrdB*), na região do gene *omp*, nos loci do gene β -operon e em regiões hipervariáveis de profagos (ADKAR-PURUSHOTHAMA et al., 2009; AHMAD et al., 2009; BASTIANEL et al., 2005; DAS et al., 2021; GUPTA et al., 2012; HU et al., 2011; KATOH et al., 2011; LIU et al., 2011; PUTTAMUK et al., 2014; TANG et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2008; TOMIMURA et al., 2009; WANG et al., 2015; ZHENG et al., 2016b; ZHOU et al., 2011; ZHOU et al., 2013).

Outra fonte de variabilidade são as *Single Sequence Repeats* – SSRs, amplamente estudadas em CLas (CUI et al., 2022; DENG et al., 2014; KATOH et al., 2011; KATOH et al., 2012; KATOH et al., 2014; ISLAM et al., 2012; MATOS et al., 2013; DA SILVA et al., 2019; de PAULA et al., 2019). Embora poucas variações genéticas tenham sido observadas nas regiões não-profágicas, os profagos possuem regiões hipervariáveis significativas desempenhando um papel crucial em estudos de diversidade populacional (FU et al., 2020; LIU et al., 2011; WANG et al., 2015; ZHOU et al., 2011; ZHOU et al., 2013).

A disponibilidade de 46 genomas de CLas, incluindo 13 completos, representa um avanço significativo na capacidade de identificação dessas regiões hipervariáveis e realização de estudos abrangentes sobre a diversidade genética dentro das populações, como demonstrado por ARMSTRONG et al. (2021), GAO et al. (2022) e ZHOU et al. (2013). Explorar os genomas de CLas e seus profagos é crucial para desvendar informações sobre o HLB, devido à fonte única de variabilidade e ao papel dos genes nessas regiões (JAIN et al., 2015; FLEITES et al., 2014; XU et al., 2023).

No presente trabalho, relatamos a obtenção do genoma circular do isolado representativo de CLas 9PA, o primeiro a ser completamente sequenciado no Brasil e o segundo na América do Sul. O genoma de 9PA foi comparado com outros genomas de CLas e divergências genéticas foram comparadas em um conjunto de isolados por PCR. Além disso foi determinado a ocorrência de profagos nesses isolados. Este estudo visa fornecer uma compreensão mais profunda da dinâmica da população de CLas no contexto do Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Obter o genoma completo do isolado brasileiro de CLas 9PA e caracterizar seus profagos.

2.2 Objetivos específicos

- I) Fechar os gaps remanescentes entre os *contigs* do genoma rascunho de 9PA via PCR e sequenciamento Sanger e obter um cromossomo circular;
- II) Caracterizar as regiões de profagos e identificar sua ocorrência (integrado ou circular) no genoma de 9PA;
- III) Comparar o genoma de 9PA com outros 13 genomas de CLas completos e definir regiões genômicas hipervariáveis (HGRs);
- IV) Fazer uma análise de variabilidade molecular da população de isolados de CLas do estado de São Paulo com base nas HGRs encontradas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Fechamento de gaps entre *contigs* no genoma de 9PA usando a reação em cadeia da polimerase PCR

O isolado 9PA é mantido em Laranja-doce (*citrus sinensis*) desde 2010 em estufa nas instalações de pesquisa da Fundecitrus em Araraquara, São Paulo, e apresenta sintomas característicos de HLB. O DNA total foi extraído da nervura central das folhas usando o método de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), conforme descrito por MURRAY e THOMPSON (1980).

Para o fechamento dos gaps, foram utilizadas amplificações via PCR e sequenciamento Sanger. Os primers (APÊNDICE D) foram desenhados utilizando o CodonCodeAligner, abrangendo regiões genômicas de 1.000 a 6.000 pb para os 157 *contigs* da primeira montagem de 9PA (JABDRZ000000000), ordenados em relação aos genomas de referência de CLas (SILVA et al., 2021). Adicionalmente foram usados dados de uma segunda montagem, consistindo de 135 *contigs* com tamanhos variando de 83 a 13.700 pb (SILVA et al., não publicado). Para aumentar a eficiência, alguns conjuntos de primers abrangeram mais de um gap. As PCRs foram realizadas em um termociclador Veriti™ 96 Well (Thermo Fisher Scientific) em tubos com 50 µL contendo 1 µL de DNA molde, 0,8 unidades de Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fischer Scientific), 10 mM de dNTPs, 1X tampão de Phusion DNA Polymerase e 10 µM de ambos os primers forward e reverse. Para fragmentos iguais ou menores que 3.000 pb, as condições de PCR compreenderam uma desnaturação inicial a 98 °C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 98 °C por 45 segundos, anelamento por 30 segundos e extensão a 72 °C por 4 minutos, concluindo com uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. No caso de fragmentos maiores que 3,000 pb, foi utilizado um protocolo alternativo, iniciando com uma etapa de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 20 segundos, anelamento por 45 segundos, extensão a 68 °C por 4 minutos e uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0% (m/v) e posteriormente purificados usando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Os fragmentos de PCR foram sequenciados pelo método de terminação de cadeia fluorescente Sanger na Macrogen.

Uma região que engloba o operon *rrnB* foi obtida usando os primers específicos rRNA2_F (5'- CGGATTTCGCTCTAAGGGAGG) e rRNA2_R (5'- ACCTCGGTCCTTTCCACAAG). Esses primers foram desenhados para anelar em regiões únicas tanto a montante quanto a jusante do operon *rrnB*. As condições de PCR repetiram as mencionadas anteriormente para fragmentos que excedem 3.000 pb, com uma temperatura de anelamento de 61 °C. O fragmento resultante foi posteriormente clonado no vetor pGEMT-Easy (Promega). A mistura de ligação foi utilizada para a transformação de células competentes de *Escherichia coli* DH5α por eletroporação (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA). O DNA clonado foi submetido a sequenciamento Sanger e as leituras foram analisadas usando o CodonCodeAligner.

3.2 Montagem e anotação do genoma

A montagem foi realizada no CodonCodeAligner, utilizando dados do genoma preliminar de 9PA, juntamente com leituras obtidas por PCR e sequenciamento Sanger após *cut-off* de qualidade. Foi estabelecida uma pontuação mínima de qualidade de 20 ao analisar as leituras. As *Open Reading Frames* (ORFs) de 9PA, incluindo a região dos profagos, foram anotadas usando o servidor Rast (<https://rast.nmpdr.org>). Proteínas e suas funções foram anotadas usando o HHpred (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de>) e o banco de dados de proteínas não redundantes do BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Os mapas de 9PA e dos profagos foram gerados pelo GCview (<http://cgview.ca/>).

3.3 Alinhamento de genoma completo de isolados de CLas

As sequências completas dos genomas dos isolados de CLas disponíveis foram adquiridas do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e estão detalhadas na Tabela 8. O software Mauve (desenvolvido pelo The Darling Lab na University of California, Santa Cruz) foi utilizado para realizar o alinhamento dos genomas usando a abordagem *progressive Mauve*, com o genoma de 9PA servindo como referência. Utilizando o software MEGA 11 (versão 11.0.13, Center for Evolutionary Functional Genomics, Arizona State University, EUA) uma árvore filogenética do tipo Neighbor-Joining (NJ) foi gerada. A comparação concentrou-se nas 14 sequências e incluiu as posições dos *codons* 1, 2 e 3, além de regiões não codificadoras. Para o cálculo da diversidade genética entre os genomas comparados, foi utilizado o modelo de distância *p* e a matriz de distância foi submetida a 1.000 randomizações para aumentar a robustez.

Tabela 8. Isolados de CLas utilizados no alinhamento de genoma completo.

Isolado	Origem	Tamanho	CDS	Nº de acesso	Tipo de Profago ^a
psy62	Estados Unidos	1.227.328	1.021	NC_012985.3	1, 4
gxpsy	China	1.268.237	1.073	NC_020549.1	1, 2, 4
Ishi-1	Japão	1.190.853	982	AP014595.1	4
A4	China	1.233.514	1.026	CP010804.2	2, 4
JXGC	China	1.225.162	1.030	CP019958.1	3, 4
JRPAMB1	Estados Unidos	1.237.165	1.038	CP040636.1	2
CoFLP	Colômbia	1.231.639	1.026	CP054558.1	1
TaiYZ2	Tailândia	1.230.623	1.028	CP041385.1	2
ReuSP1	França (Ilha Reunião)	1.230.064	1.023	CP061535.1	1
AHCA1	Estados Unidos	1.233.755	1.010	CP029348.1	1, 3, 4
GDCZ	China	1.230.507	1.057	CP118922.1	2
PGD	China	1.230.220	1.030	CP100754.1	2
PYN	China	1.231.257	1.028	CP100417.1	1

a4 = prophage-like sequence

Fonte: a autora

Os primers utilizados para amplificar as HGRs de CLas (Tabela 9) foram desenhados usando o CodonCodeAligner, utilizando dados gerados pelo Mauve. Os critérios de seleção para os HGRs obtidos pela comparação dos genomas ao longo deste estudo basearam-se em i) na presença ou ausência na maioria dos 13 genomas comparados em relação a 9PA, e ii) na cobertura de regiões codificantes cromossômicas e de profagos.

Tabela 9. Primers utilizados para amplificação das HGRs na população de CLas.

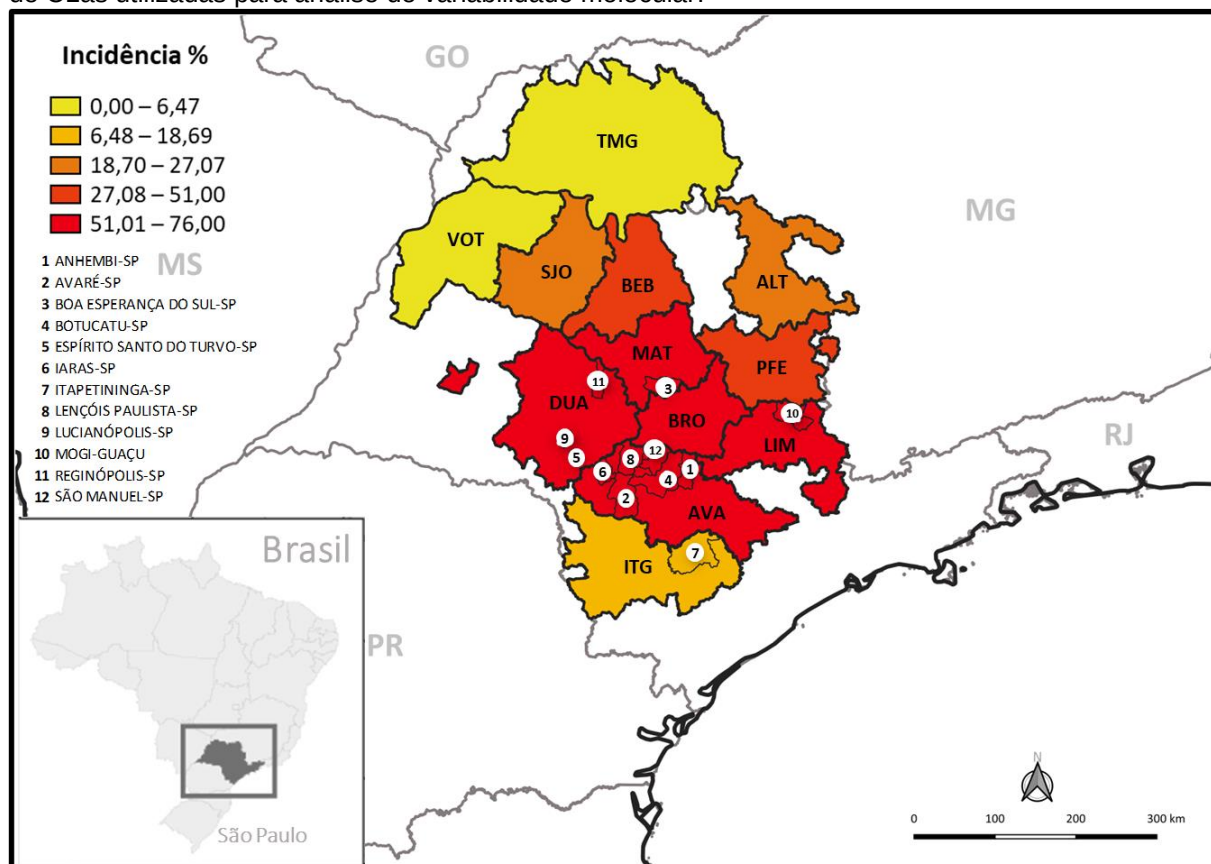
Primers	Sequência 5' – 3'	T (°C)	Referência
2_F	TATCGTCCTCCCCCTTTTGC	61	Esse trabalho
2_R	GAGCATGGAGAATTCCTATCGA		
4_F	CGTCCTCTAAAACTCCGTTGC	61	Esse trabalho
4_R	AGTAGGTTTACCGTGCGCTT		
6_F	TTGCGGGCTCTGCTTCTTC	61	Esse trabalho
6_R	ACGGTGGCTACAGCAGC		
7_F	ACGGTTTGCTTAAAGACGACA	61	Esse trabalho
7_R	GCCGTTACTTCTCTTACCGC		
12_F	AAGTGGGTCTGGGTGGTTTTT	61	Esse trabalho
12_R	GTACGGTAGTTCACAGGCGA		
LJ1194f	TCAACAGAATACGCATCCAC	53	ARMSTRONG et al., 2022
LJ1195r	TCCTCATGAACGTGATTTGC		
LJ240f	AAGAGCCTCATGCACATCAG	53	ARMSTRONG et al., 2022
LJ234r	CTGATATGTTAGTTCAAGCGG		

Fonte: a autora

3.4 Amostragem para análise de variabilidade molecular

Foram utilizadas amostras sintomáticas de campo de laranjeiras-doces para a análise de variabilidade molecular de isolados brasileiros de CLas. No período entre setembro e outubro de 2022, um total de 68 amostras foi coletado em 12 localidades dentro de cinco áreas caracterizadas por incidências médias e altas de HLB: ITAPETININGA (ITA), AVARÉ (AVA), DUARTINA (DUA), LIMEIRA (LIM) e MATÃO (MAT) (Figura 44).

Figura 44. Mapa do estado de São Paulo ilustrando a localização geográfica da coleta das amostras de CLas utilizadas para análise de variabilidade molecular.



As amostragens foram concentradas em 12 localidades dentro de cinco regiões caracterizadas por incidências médias e altas de Huanglongbing, nomeadamente ITAPETININGA (ITG), AVARÉ (AVA), DUARTINA (DUA), LIMEIRA (LIM) e MATÃO (MAT).

Fonte: Fundecitrus

O DNA foi extraído utilizando o método CTAB e analisado por qPCR (LI et al. 2006) e PCR convencional (operon *rplKAJL-rpoBC*) para confirmar a presença de CLas (HOCQUELLET et al. 1999). Também foi realizada eletroforese em gel para confirmar a amplificação, uma vez que a caracterização molecular foi conduzida nesse formato. Adicionalmente, amostras de DNA de isolados de CLas mantidos em estufa no Fundecitrus, São Paulo - Brasil (1PA, 2PA, 3PA, 9PA), e amostras de DNA de isolados da Flórida (F), China (B), Costa Rica (C) e Índia (I) foram usados como controles (BASTIANEL et al. 2005, DA SILVA et al. 2019).

3.5 Análise de variabilidade molecular da população de CLas em São Paulo

Para a análise de variabilidade molecular das HGR, foram realizados PCRs contendo molde de DNA a 100 ng/μL, 0,8 unidades de Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase, dNTPs a 0,2 mM, tampão Phusion DNA Polymerase a 1X e 0,2 μM de ambos os primers forward e reverse, em um volume total de 20 μL. As reações foram iniciadas com uma etapa de desnaturação a 98 °C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos de 98 °C por 45 segundos, 55 °C a 63 °C (dependendo do conjunto de primers, consulte Tabela 9) por 30 segundos, uma extensão a 72 °C por 4 minutos e uma etapa final de extensão a 72 °C por 10 minutos. A eletroforese em gel de agarose foi realizada conforme indicado anteriormente.

Adicionalmente, a presença de uma região de ~8,3 kb, previamente reportada em estudos do genoma de CLas psy62 (ARMSTRONG et al. 2022; ZHANG et al. 2021), foi avaliada utilizando PCR com pares de primers específicos (Tabela 9). As misturas de reação e as condições da PCR seguiram o protocolo descrito em ARMSTRONG et al. (2022).

3.6 Caracterização dos profagos

Os alinhamentos dos profagos de 9PA com SC1 (HQ377372, tipo 1), SC2 (HQ377373) e P-JXGC-3 (KY661963, tipo 3) foram realizados utilizando o programa SnapGene (versão 5.1.7, GSL Biotech LLC, San Diego, Califórnia, EUA) e o alinhamento global BLAST. Os locais de integração no cromossomo 9PA foram verificados por amplificações via PCR baseadas em locais previamente descritos (ZHANG et al. 2011) utilizando um conjunto de primers específicos (Tabela 10). As condições de PCR foram realizadas de acordo com o protocolo descrito em ZHANG et al. (2011). Os produtos obtidos foram sequenciados por Sanger, conforme descrito anteriormente.

Tabela 10. Primers utilizados para verificação de integração dos profagos no genoma de 9PA.

ID	Primers	Sequências	Tamanho do fragmento (pb)	T (°C)	Referência
A	G17F	TTGATCCTCGTCCTGTCCTT	2.608	59	Zhang et al. (2011)
	G17R	ATTAGTCCCAACATCTCAGT			
B	04952F	TCATTTGTGGGGAGAGAAGT	2.616	59	Zhang et al. (2011)
	G17R	ATTAGTCCCAACATCTCAGT			
C	G17F	TTGATCCTCGTCCTGTCCTT	2.210	61	Zhang et al. (2011)
	33575RS	TCGGATCATAGGCTCAAACC			
G	G17F	TTGATCCTCGTCCTGTCCTT	2.832 ^a 4.125 ^b	61	Zhang et al. (2011) Este trabalho
	HP2_R	GGTATGGTGGAGTGTGAAAGAG			
H	HP32_F	ACCAGCAGATGAGCGAAATAG	2.446	59	Este trabalho Zhang et al. (2011)
	33575RS	TCGGATCATAGGCTCAAACC			
P	04952F	TCATTTGTGGGGAGAGAAGT	2.218	61	Zhang et al. (2011)
	33575RS	TCGGATCATAGGCTCAAACC			

^a Refere-se ao fragmento de PCR para a forma circular do profago do tipo 1.

^b Refere-se ao fragmento de PCR para a forma circular do profago do tipo 3.

Fonte: a autora

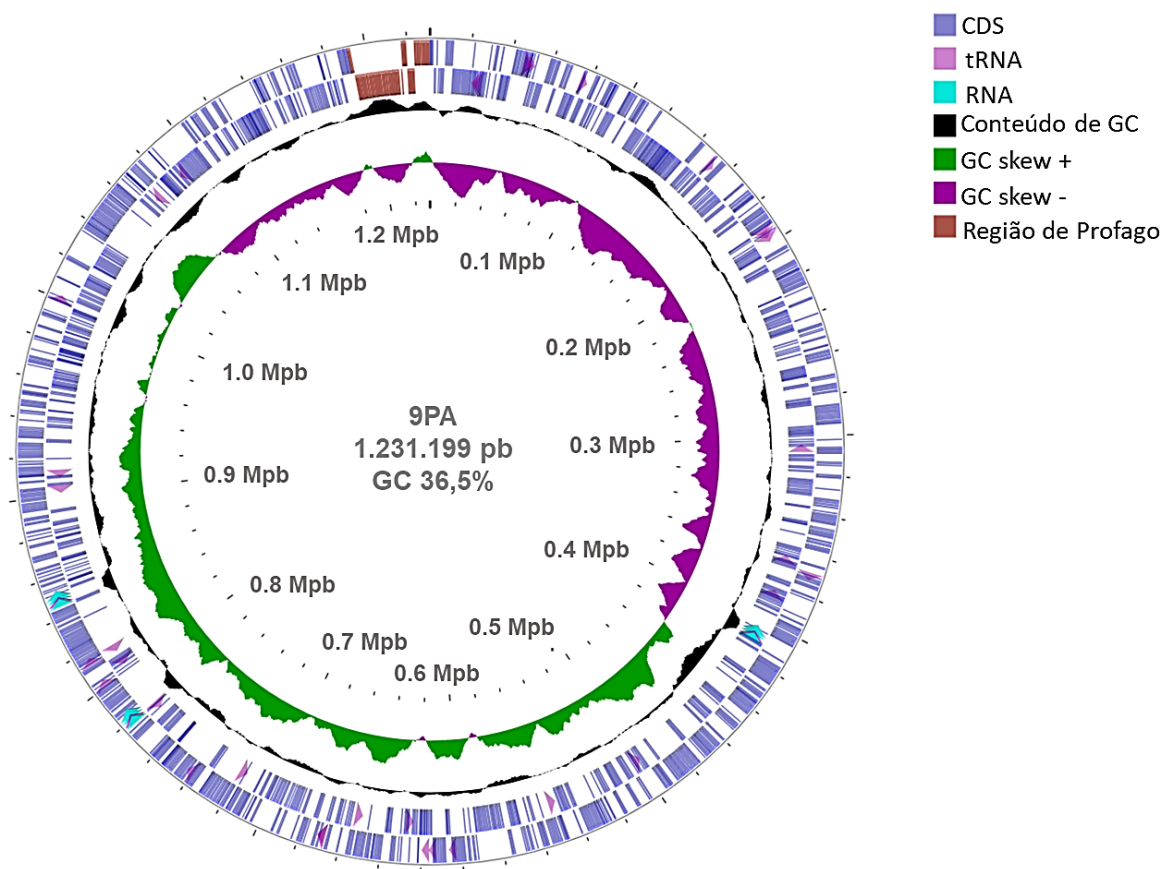
4 RESULTADOS

4.1 Fechamento de gaps, montagem e características gerais do genoma de 9PA

As amplificações resultaram em um total de 124 produtos de PCR e, após sequenciamento Sanger, um total de 209 *reads*, variando de 59 pb a 1.097 pb, foram gerados. Os *reads* foram efetivamente utilizados para cobrir os gaps e unir os *contigs* restantes do genoma 9PA. Uma atenção especial foi dedicada à amplificação do operon ribossômico *rrnB*, uma vez que foram encontrados alguns SNPs em *contigs* que abrangiam essas regiões da montagem prévia do 9PA. A sequência de 7.962 pb, que abrange o operon *rrnB* (777.181 a 785.142), apresentou uniformidade com outros operons ribossômicos de CLas, sugerindo a ausência de variabilidade intra-operon. Consequentemente, ela foi utilizada para confirmar as regiões 5S, 16S e 23S de ambos os *rrnA* e *rrnC*, já que compartilham sequências idênticas, e foi integrada à montagem do 9PA. Coletivamente, as leituras de Sanger totalizaram 183.294 pb, constituindo 14,9% do genoma 9PA.

A anotação via RAST revelou 1.190 sequências codificadoras (CDS), das quais 41 são do profago, e 53 RNAs, incluindo 44 moléculas de tRNA e três operons ribossômicos completos. Por fim, esses esforços culminaram na montagem bem-sucedida de um cromossomo circular com 1.231.199 pb com um conteúdo de GC de 36,5% (Figura 45).

Figura 45. Representação esquemática do genoma do isolado 9PA de CLas.



Representação circular do genoma de CLas 9PA com 1.231.199 pb. Os destaques dos círculos representam: CDS (azul); região do profago P-9PA-1 (vermelho escuro); tRNA (rosa); operons rRNA (azul claro); conteúdo de % G+C (preto) e skew GC $[(G+C)/(G-C)]$ (verde-roxo).

Fonte: a autora

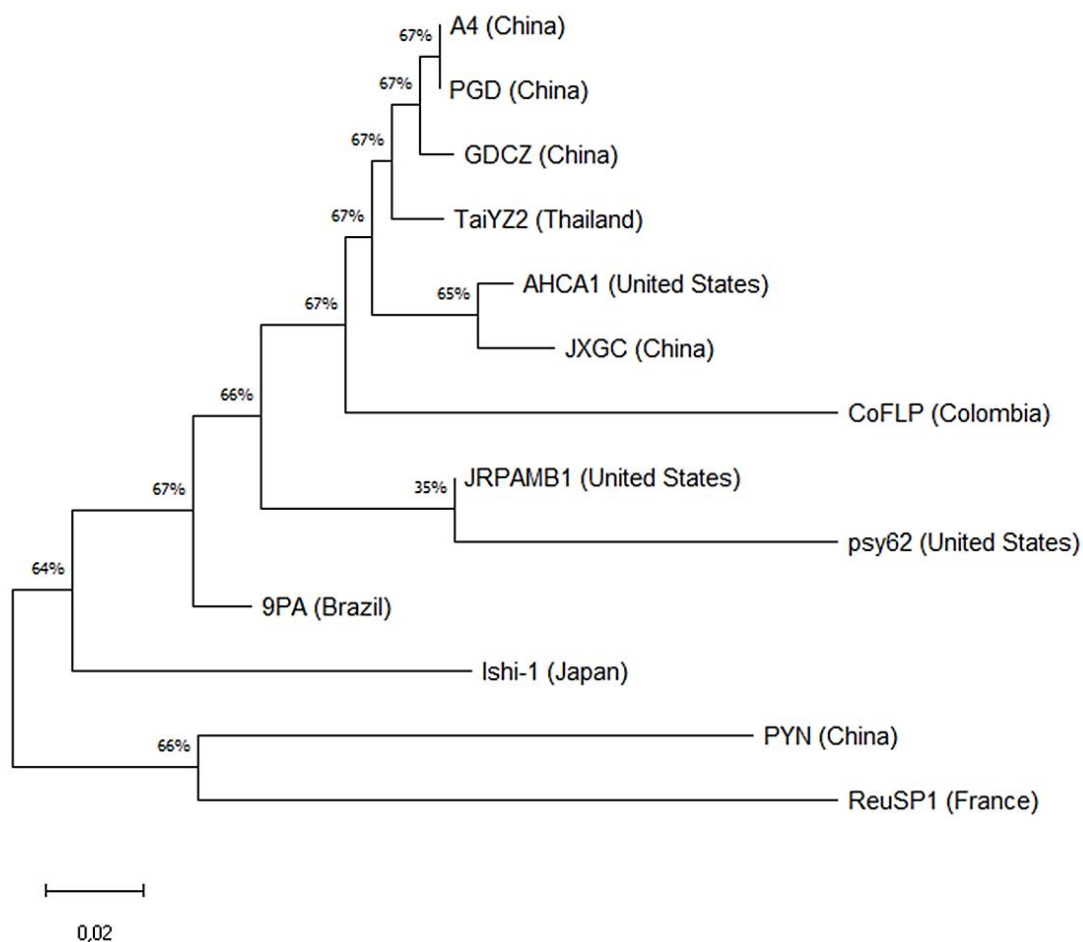
4.2 Comparação entre genomas de isolados de CLas

A sequência do genoma do isolado 9PA foi comparada com 13 genomas completos disponíveis de isolados de CLas, revelando oito blocos localmente colineares (*Locally colinear blocks* -LCBs). O LCB1 (564.434 pb, abrangendo da base 637.063 a 1.223.426 em relação ao 9PA) exibiu 92,4% de identidade entre pares, com apenas 73,5% de locais idênticos devido a variações causadas pela região do profago. Em contraste, o LCB7 (631.420 pb, da base 5.643 a 637.062) demonstrou alta similaridade, com 97,7% de identidade entre pares e 99,5% de locais idênticos. Os demais LCBs estão localizados dentro da região de profago e exibiram identidades e distribuições distintas nos genomas: LCB2 (7.161 pb - 96,7% de identidade entre pares e 90,2% de locais idênticos; ausente em Ishi-1), LCB3 (702 pb - 65,8% de identidade entre pares e 37,9% de locais idênticos; ausente em CoFLP, 9PA, Ishi-1, psy62 e ReuSP1), LCB4 (172 pb - 35,9% de identidade entre pares e 19,8% de locais idênticos; ausente em psy62, 9PA, PYN e Ishi-1), LCB5 (49 pb - 96,4% de identidade entre pares e 89,8% de locais idênticos; ausente em 9PA, Ishi-1, AHCA1, GDCZ, psy62, CoFLP e JXGC), LCB6 (6.499 pb - 98,1% de identidade entre pares e 91,6% de locais idênticos) e LCB8 (135 pb - 89,9% de identidade entre pares e 86,7% de locais idênticos). Notavelmente, LCB3, LCB4, LCB5 e LCB8 são regiões repetitivas que compreendem fragmentos do gene da DNA helicase, marcando o local de inserção de profago nos genomas.

Os *mismatches* entre os genomas foram 9.091 e os gaps/inserções foram 992, incluindo a região do profago. A árvore filogenética *unrooted* foi utilizada para descobrir a relação evolutiva entre os genomas de CLas. A deleção de posições ambíguas resultou em 1.846.468 posições definitivas (Figura 46). A análise revela distintamente dois grupos divergentes originados de um ancestral comum. De um lado, um grupo é formado por representantes da China (A4, PGD, GDCZ, TaiYZ2 e JXGC), Estados Unidos (AHCA1, JRPAMB1 e psy62), Colômbia (CoFLP), Brasil (9PA) e, de forma mais distante, Japão (Ishi-1). Notavelmente, os isolados A4, PGD, GDCZ, TaiYZ2, AHCA1 e JXGC constituem um subgrupo intimamente relacionado dentro desse agrupamento. Por outro lado, o grupo mais divergente é formado por um representante da China (PYN) e França (ReuSP1). Esse agrupamento destaca a divergência observada entre os isolados principalmente da Ásia e do grupo mais amplo. A incorporação do isolado gxpsy na árvore filogenética resultante revelou-se

inatingível utilizando ferramentas e métodos para explorar as relações evolutivas entre os 14 genomas neste estudo.

Figura 46. Árvore filogenética de 13 isolados de CLas.



A árvore filogenética foi construída usando o método Neighbor-Joining (NJ). A árvore ótima é apresentada com o isolado gxpsy não alinhada ao grupo. A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de ramos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas utilizadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de *p-distance* e estão nas unidades do número de diferenças de bases por sítio. A proporção de sítios onde pelo menos uma base não ambígua está presente em pelo menos uma sequência para cada clado descendente é mostrada ao lado de cada nó interno na árvore. As posições dos códons incluídas foram 1^a+2^a+3^a+Não codificante. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequências (opção de exclusão de pares).

Fonte: a autora

A avaliação dos dados gerados pelo Mauve visava descobrir diferenças significativas entre os genomas do isolado 9PA e os previamente sequenciados. Após um processo de seleção manual, selecionamos seis HGRs dentre 252, que apresentaram disparidades nos genomas comparados. Três desses segmentos estão localizados dentro da região de profago e podem ser úteis para identificar diferentes tipos de profagos (Tabela 11).

Tabela 11. Primers e características das HGRs.

ID	Primers	Região	Posição*
HGR_2	2_F/2_R	Cromosomal	976.133...978.271
HGR_4	4_F/4_R	Profago	1.216.242...1.216.534
HGR_6	6_F/6_R	Profago	1.204.232...1.204.252
HGR_7	7_F/7_R	Profago	1.191.702...1.193.101
HGR_12	12_F/12_R	Cromosomal	346.667...346.703
HGR_M	LJ1194f/ LJ1195r e LJ1240f/ LJ1234r	Cromosomal	1.078.191...1.079.660

*Referente ao genoma de 9PA.

Fonte: a autora

A HGR_2 abrange uma sequência de 2.139 pb, ausente nos genomas de JRPAMB1 e psy62. Essa sequência está posicionada entre as coordenadas 976.133 e 978.271 no genoma do 9PA. Nessa região, existem três ORFs: duas codificando proteínas hipotéticas e uma codificando uma proteína repressora de fagos (respectivamente CD16_04340, CD16_04345 e CD16_05700 do isolado A4). Vale ressaltar que a princípio HGR_2 não foi encontrada no genoma do 9PA no alinhamento obtido anteriormente; no entanto, por meio de validação subsequente por PCR, a sequência ausente foi incorporada com sucesso no genoma.

A HGR_4 representa um segmento que abrange uma região variável de profago (1.216.242 a 1.216.534 no 9PA), que faz parte de uma proteína reguladora transcricional/proteína repressora associada a fagos C2 (SC1_gp125 do profago SC1). Apesar de estar localizada na região de genes precoces, essa sequência demonstrou um padrão de distribuição divergente entre os diferentes tipos de profagos. Os dados de PCR mostraram a presença de uma região de 293 pb e 624 pb, respectivamente, nos profagos do tipo 1 e 3 do 9PA (23.677 a 23.969 e 15.333 a 15.956), enquanto, por análise teórica de sequência, SC1 apresentou divergências que impedem sua amplificação. Em SC2, utilizando a mesma análise teórica, constatou-se que um fragmento de 601 pb é amplificado.

A HGR_6 compreende uma sequência de 21 pb (1.204.232 a 1.204.252 no 9PA) dentro de uma ORF que codifica uma proteína de integridade da parede celular de profago, alternativamente anotada como uma possível bacteriocina do tipo colicina Ia (SC1_gp060 do SC1). Notavelmente, por análise de sequência, essa ORF foi detectada apenas em isolados que carregam o profago do tipo 1, como gxpsy, psy62, ReuSP1 e PYN. No entanto, considerando que o primer 6_F foi especificamente desenhado na sequência de 21 pb que apresenta divergências na ocorrência em isolados de CLas avaliados, é possível que isolados que possuem o profago do tipo 1 possam não exibir amplificação como resultado. Isso foi observado em psy62.

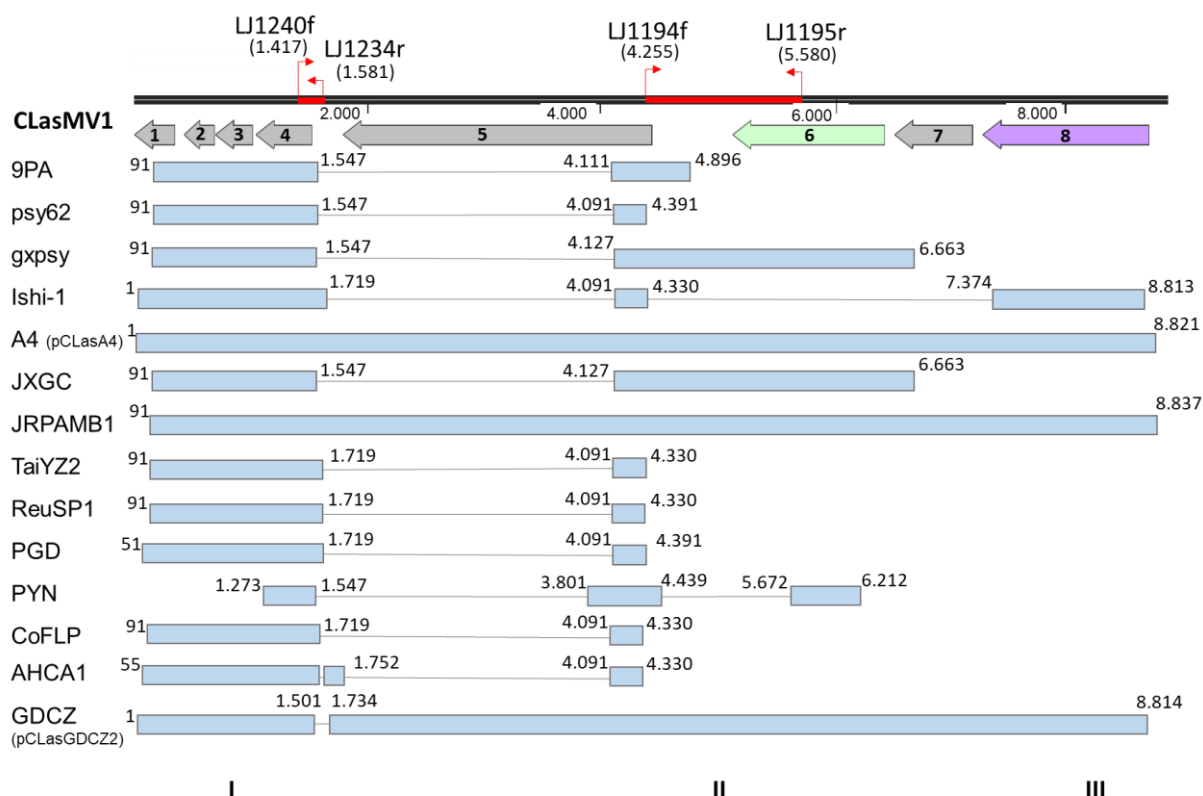
HGR_7 exibe variabilidade nas regiões de profagos entre os isolados. A sequência está posicionada na junção das regiões de genes precoces e tardios (de 1.191.702 a 1.193.101 em 9PA) e codifica para uma guanilato quinase e uma proteína hipotética (SC1_gp230 e SC1_gp235 do SC1). Os dados de PCR para o profago do tipo 1 de 9PA resultaram em um fragmento de 1.400 pb, enquanto que, teoricamente para SC2, resultaria em um fragmento de 2.593 pb codificando cinco proteínas. Isso inclui uma possível proteína de imunidade a colicina (SC2_gp255 do SC2). Para profagos do tipo 3 (em ambos os isolados 9PA e JXGC), não foi evidenciado sítio para o primer 7_F. Mesmo entre isolados que abrigam os mesmos tipos de profagos (tipo 1 ou 2), padrões distintos de amplificação podem ser obtidos.

HGR_12 é uma região variável de repetição em tandem (AGACACA) que foi avaliada previamente em estudos genéticos envolvendo isolados de CLas (CHEN et al., 2010; DA SILVA et al., 2019; GOSH et al., 2015). Esta região está localizada nas coordenadas 346.667 a 346.701 no genoma de 9PA e se encontra em uma ORF que codifica uma proteína repressora de fagos C2 (CLIBASIA_01645 do psy62). Entre os isolados analisados, 9PA, JRPAMB1, psy62 e PYN exibiram cinco repetições de HGR_12, enquanto que A4, JXGC e PGD apresentaram seis repetições. Por outro lado, ReuSP1, AHCA1, GDCZ e TaiYZ2 mostraram sete repetições, Ishi-1 e gxpsy exibiram oito repetições, e CoFLP se destacou com 17 repetições.

Por fim, HGR_M foi identificada como uma região variável recém descoberta em isolados de CLas. Enquanto ARMSTRONG et al. (2022) identificaram uma sequência de ~8.300 pb, ZHANG et al. (2021) apontaram uma de 8.869 pb. Essa sequência engloba oito ORFs e corresponde a um fago de DNA de fita simples da família *Microviridae*, chamado CLasMV1 (Número de Acesso GenBank CP045566.1). Entre as oito ORFs do CLasMV1, seis são categorizadas como hipotéticas e duas têm

funções reconhecidas, anotados como proteína de iniciação de replicação (GE519_gp06) e uma proteína do capsídeo principal (GE519_gp08). Por meio de uma análise de Blastn, ficou evidente que a sequência do fago CLasMV1 está totalmente intacta em A4 (Fago Liberibacter pCLasA4, Número de Acesso GenBank N890136.1) e JRPAMB1, exibindo 100% de identidade e cobertura, enquanto que em GDCZ (Fago Liberibacter pCLasGDCZ2, Número de Acesso GenBank MN890137.1) falta um fragmento de ~200 pb. Em outros isolados de CLas disponíveis, sua presença é apenas parcial, revelando três regiões de similaridade: I, II ou III (Figura 47). A Região I mostrou consistência na aparência e parece ser conservada entre os genomas, enquanto que as Regiões II e III exibem uma maior divergência. Ao comparar a sequência do CLasMV1 com 9PA, dois hits parciais foram observados: I, da base 91 a 1.547 (1.078.191 a 1.079.660 em 9PA) e II, da base 4.111 a 4.896 (1.034.506 a 1.034.114 em 9PA) (Figura 47). As sequências exibiram 99,1% e 38,4% de identidade entre pares, respectivamente.

Figura 47. Análise de BLASTn para detectar a presença do CLasMV1 nos genomas de CLas, identificado como HGR_M.



Retângulos azuis-claros representam regiões de similaridade de sequência entre o CLasMV1 e os genomas de CLas, indicando hits significativos. Os números indicam posições específicas de início e término onde os hits foram detectados. Retângulos cinzas correspondem a ORFs hipotéticas 1 a 5 e 7 do CLasMV1, e retângulos verde claro e roxo claro (6 e 8) representam a proteína do capsídeo principal e a proteína de iniciação de replicação, respectivamente. Setas vermelhas marcam as regiões dos genomas onde os primers LJ1194f/ LJ1195r e LJ1240f/ LJ1234r se anelam. As posições dos locais de anelamento dos primers estão entre parênteses, indicando suas posições iniciais e finais no genoma do CLasMV1, e as três regiões principais dos hits do BLASTn são representadas por I, II e III.

Fonte: a autora

4.3 Ocorrência de seis HGRs em isolados de CLas do campo no estado de São Paulo

Neste estudo, foram obtidas 68 amostras de isolados de 12 localidades em cinco áreas com média e alta incidência de HLB no estado de São Paulo. Essas amostras foram distribuídas da seguinte forma: 37 de AVA, 14 de DUA, 7 de ITG, 6 de LIM e 4 de MAT. A quantificação dessas 68 amostras, juntamente com as amostras de isolados de controle, revelou valores baixos de *cicle threshold* (Ct) e fragmentos de PCR consistentes com a presença de CLas (Dados não mostrados). Na análise das seis HGRs, os isolados foram categorizados em 21 perfis distintos, de A a U, de

acordo com o tamanho dos produtos de amplificação (Figura 48). Os isolados de campo representam 16 perfis, de A a P.

Em relação aos 68 isolados de campo, 20,6% (14 no total) exibiram o perfil A, idêntico ao perfil do isolado 9PA. Outros 41,2% dos isolados (28) apresentaram o perfil B e 10,3% (7) tinham o perfil C. Os 27,9% restantes dos isolados (19) exibiram uma variedade de 13 perfis, rotulados de D a P. Dentro desse grupo, os perfis F, I, O e P cada um tinham dois isolados representativos, enquanto o perfil G tinha três. Por fim, os perfis D, E, H, J, K, L, M e N foram representados por um isolado cada (Figura 48).

Figura 48. Classificação das 68 amostras de isolados de campo e amostras de controle de CLAs.

Perfil	HGR_2		HGR_4			HGR_6		HGR_7			HGR_M		HGR_12			%
	715	2822	292	601	624	1666	-	1400	2290	2593	330	1330	499	513/520	583	
A (9PA, 1PA, 2PA)																20.6
B																41.2
C																10.3
D																1.5
E																1.5
F																2.9
G																4.4
H																1.5
I																2.9
J																1.5
K																1.5
L																1.5
M																1.5
N																1.5
O																2.9
P																2.9
Q (Flórida)																-
R (Costa Rica)																-
S (Índia)																-
T (Behai)																-
U (3PA)																-

Os isolados analisados foram categorizados em perfis distintos de A a P (para isolados de campo) e de Q a U (para isolados-controle) com base nos padrões de amplificações de PCR observados para as 6 HGRs avaliadas. Os números abaixo das HGRs estão relacionados ao tamanho esperado dos produtos de PCR.

Fonte: a autora

De um total de 68 isolados, 94,1% (64) amplificaram para a HGR_2, enquanto 5,9% (4) não mostraram amplificação para esta região (Apêndice D). No caso de HGR_4, 89,7% (61) dos isolados apresentaram simultaneamente fragmentos de 292 pb e 624 pb, indicando que provavelmente ambos os profagos tipo 1 e 3 estavam presentes. Nos isolados restantes, 5,9% (4) e 4,4% (3), respectivamente, apresentaram amplificações apenas de 624 pb (tipo 3) ou 292 pb (tipo 1). Assim,

indicando que enquanto cerca de 90% dos isolados possuem sequências de dois profagos, ~10% possuem sequência de apenas um. Em relação a HGR_6, quase 87% (59) dos isolados apresentaram amplificação, enquanto 13% (7) não amplificaram. Da mesma forma, para a HGR_7, 94% (64) dos isolados exibiram amplificação, enquanto que 6% (4) não apresentaram. As HGRs 4, 6 e 7 fornecem uma visão completa para entender a ocorrência dos profagos. A identificação do profago do tipo 1 é caracterizada pela amplificação de um fragmento de 293 pb. A ambiguidade entre 624 pb (tipo 3) e 601 pb (tipo 2) pode ser resolvida por meio da amplificação de 1.666 pb e 1.400 pb para HGR_6 e HGR_7, respectivamente, sendo essa uma possibilidade apenas na presença do profago do tipo 1. Em casos em que o profago do tipo 2 está presente, quando utilizado os primer para HGR_7 é obtido um fragmento distinto de 2.290 bp ou 2.593 pb, como observado em controles de Behai, Costa Rica e Flórida.

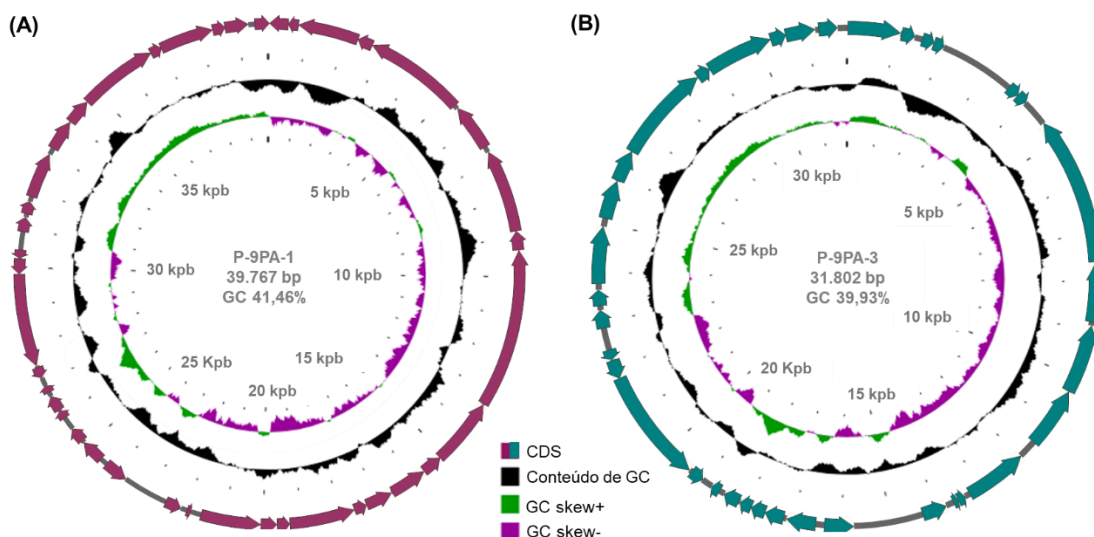
Especificamente, HGR_12 apresentou três possibilidades com base na comparação de genomas e no tamanho teórico do fragmento: i) fragmento de 499 pb, ii) fragmento variando de 513 a 520 pb, e iii) fragmento de 583 pb. Em aproximadamente 76% (52) dos isolados houve amplificação do fragmento menor (499 pb), enquanto 14,7% (10) exibiram amplificações para os tamanhos intermediários (variando de 513 a 520 pb), e 4,4% (3 amostras) tiveram amplificações para o fragmento maior (de 583 pb). Os isolados restantes (3) não apresentaram amplificação nesta região).

No contexto da análise de variabilidade para HGR_M, foram identificados dois perfis distintos. Em 100% (68) dos isolados analisados, foi observada a amplificação de um fragmento de 333 pb contendo a região I (ver Figura 47). Entre esses isolados, 66,2% apresentaram amplificação simultânea de um fragmento de 333 pb e um fragmento de 1.333 pb, abrangendo ambas as regiões I e II. Em relação às amostras de isolados-controle, elas exibiram perfis distintos: 9A, 1PA e 2PA foram agrupados no perfil A, enquanto a Flórida foi identificada como perfil Q, Costa Rica como perfil R, Índia como perfil S, Behai (China) como perfil T e 3PA como perfil U. Apesar de serem classificados como perfis distintos, Flórida e Costa Rica exibiram um padrão de amplificação semelhante, com apenas duas diferenças notáveis na amplificação das HGR_M e HGR_12.

4.4 Caracterização dos profagos

Anteriormente descritos como profagos dos tipos 1 e 3 (SILVA et al. 2021), os *contigs* 156 (JABDRZ010000156.1) e 157 (JABDRZ010000157.1) do genoma preliminar de 9PA foram designados como P-9PA-1 e P-9PA-3 de acordo com a nomenclatura estabelecida (ZHENG et al. 2017). Os dados gerados pelo GCview mostraram que o genoma do P-9PA-1 possui 39.797 pb e um conteúdo de GC de 41,46%, enquanto o P-9PA-3 tem 31.802 pb e um conteúdo de GC de 39,93% (Figura 49).

Figura 49. Representação esquemática das formas circulares dos profagos P-9PA-1 (A) e P-9PA-3 (B).

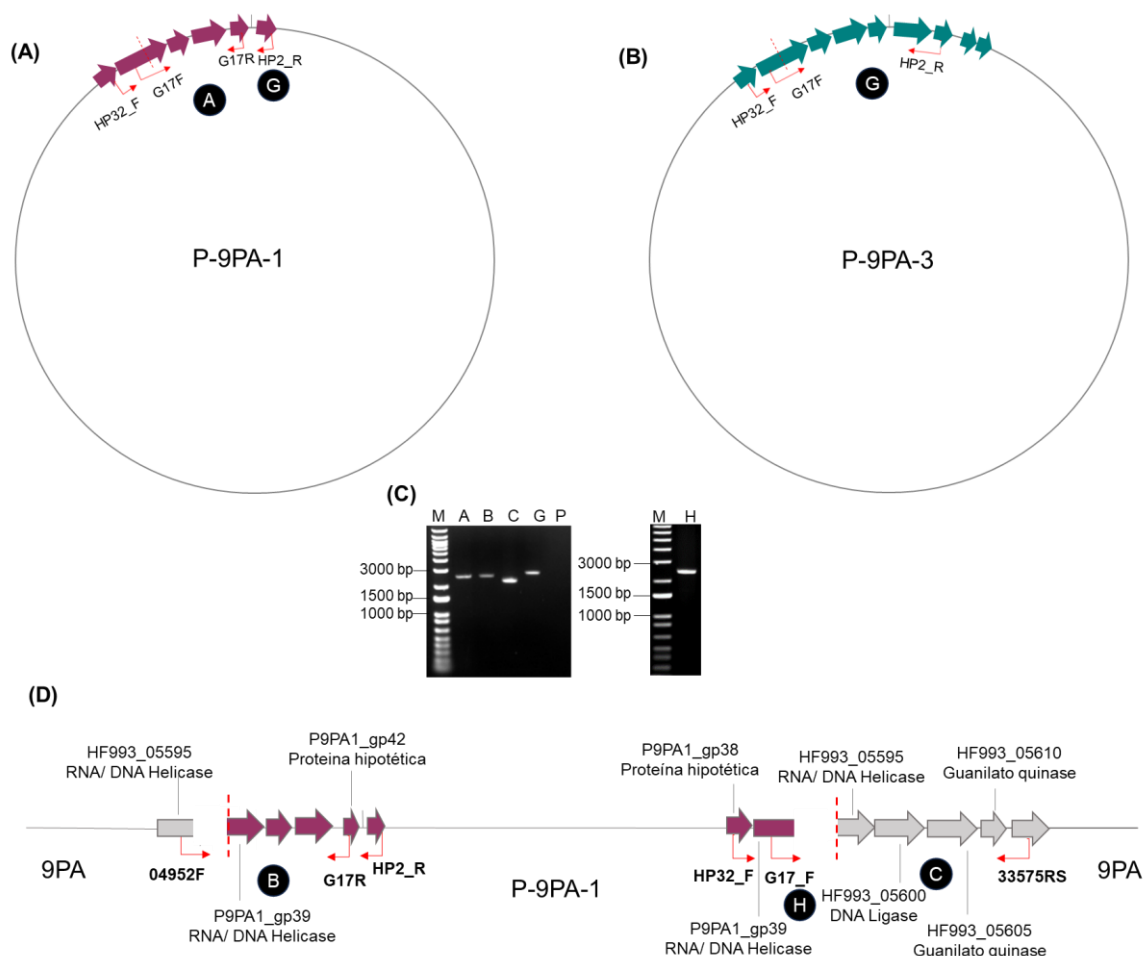


Da parte externa para a parte interna, são mostradas as sequências codificantes (CDS) do genoma de P-9PA-1 e P-9PA-3 (em vermelho escuro e verde, respectivamente), o conteúdo de GC (em preto) e o GC skew $[(G-C)/(G+C)]$ (em verde claro e roxo).

Fonte: a autora

Amplificações via PCR com primers específicos baseados em regiões de integração de profagos no cromossomo de CLas indicaram que o P-9PA-1 ocorre tanto como profago circular (conjuntos de primers A e G) quanto como profago integrado (conjuntos de primers B e C), enquanto que para o P-9PA-3 há a certeza apenas de sua não integração com base no conjunto de primers utilizados. (Figura 50).

Figura 50. Organização dos profagos P-9PA-1 e P-9PA-3 no genoma do isolado 9PA.



Em (A) e (B) estão representadas as formas circulares dos profagos. Em (C) estão os resultados das amplificações via PCR quando conjuntos de primers A (G17F/ G17R – 2.608 pb), B (04952F/G17R – 2.616 pb); C (G17F/ 33575RS – 2.210 pb), G (G17F/ HP2_R – 2.832 pb ou 4.125 pb), P (04952F/ 33575RS – 2.218) e H (HP32_F/ 33575RS – 2.446 pb) foram usados. A canaleta M é o marcador de 1 kpb plus da Invitrogen. Em (D) está indicado a forma linear *in tandem* do profago P-9PA-1. A região de integração é delimitada por duas linhas tracejadas em vermelho. As caixas de setas vermelhas escuras e cinzas representam, respectivamente, os genes do profago e os genes cromossômicos. As setas vermelhas indicam o sítio de reconhecimento dos primers. Seis conjuntos de primers (Círculos pretos) foram combinados para determinar a presença das formas circular e linear dos profagos.

Fonte: a autora

O profago P-9PA-1, compreendendo 41 ORFs, exibiu identidades de sequência de 83%, 65% e 67% quando comparado com SC1, SC2 e P-JXGC-3, respectivamente. Em comparação com SC1, foram observadas 841 diferenças, incluindo 815 *mismatches* e 26 gaps/inserções. Embora seis ORFs do P-9PA-1 tenham mostrado diferenças significativas à nível de nucleotídeos, o rearranjo dos profagos na região de genes tardios foi quase idêntico, com 91% de identidade de sequência (Figura 51). Na região dos genes tardios, P9PA1_gp01, P9PA1_gp02, P9PA1_gp03 e P9PA1_gp04 exibiram 73% de identidade em nível de nucleotídeos

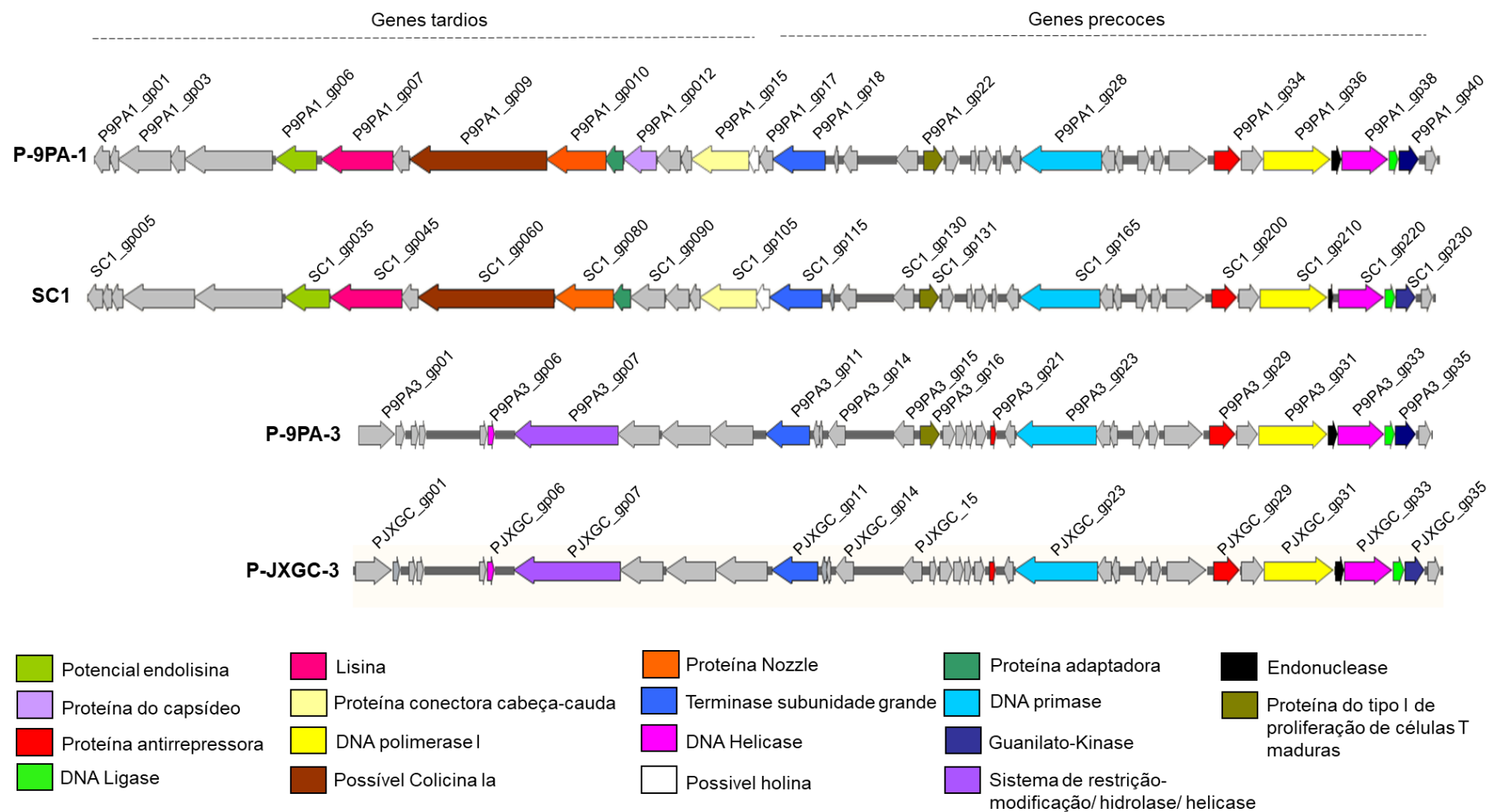
com ORFs SC1_gp005, SC1_gp010, SC1_gp015 e SC1_gp020, mas demonstraram 99,95% de identidade (100% de cobertura) com um mosaico contendo sequências parciais codificando 2 guanilato quinases putativas (SC2_gp230 e SC1_gp235) e 4 proteínas hipotéticas (SC1_gp005, SC1_gp010, SC1_gp030 e SC1_gp035) de profagos SC1 e SC2. Um cenário semelhante foi observado para P9PA1_gp17, que não foi encontrada em SC1, mas coincidiu com um rearranjo de uma proteína de junção de cabeça-cauda e uma holina putativa (SC1_gp105 e SC1_gp110). Com base em anotação de função de proteína, P9PA1_gp12 compartilha funções semelhantes com a proteína do capsídeo principal SC1_gp090, no entanto, as ORFs exibem uma baixa porcentagem de identidade de sequência (47%). Apesar disso, P9PA1_gp12 mostrou alta identidade a nível de sequência (100% de identidade e cobertura) com ORFs de profagos do tipo 1 dos isolados SGCA-5, PYN, ReuSP1 e gxpsy.

Na região de genes precoces, comum entre a maioria dos profagos CLas, P-9PA-1 apresentou 92% de identidade com o SC1, diferindo apenas em três ORFs (Figura 51). Nessa região, P9PA1_gp20 apresentou 44% de cobertura com uma subunidade pequena terminal SC1_gp120, mas mostrou 100% de identidade à nível de nucleotídeos com a proteína hipotética PJXGC_gp14 de P-JXGC-3. Além disso, P9PA1_gp21, proposta como uma proteína reguladora transcricional, exibiu até 91% de identidade (100% de cobertura) com ORFs das regiões profágicas tipo C, D, H e G do isolado FL-Periwinkle. Esses tipos foram designados de acordo com diferentes perfis de mosaicos por ZHOU et al. (2013) em bibliotecas de profagos na Flórida. Além disso, esse ORF exibiu 98% de identidade (92% de cobertura) com a putativa proteína repressora relacionada a fagos C2 SC2_gp125. Por fim, P9PA1_gp40 foi anotada como uma guanilato quinase, assim como SC1_gp230, mas ambas compartilham apenas 60% de identidade à nível de nucleotídeos. Ainda assim, essa ORF exibe altas similaridades (até 99% de identidade e 94% de cobertura) com ORFs de profagos tipo 1 e 2 de vários isolados de CLas.

Passando para o Profago P-9PA-3, que compreende 36 ORFs, o alinhamento com P-JXGC-3 revelou 112 *mismatches* e 9 gaps/ inserções. Essas diferenças estão principalmente em regiões não codificadoras e das ORFs P9PA3_gp15 e P9PA3_gp16 (genes precoces). Apesar dessas variações, os profagos compartilharam uma notável identidade de 98%, com o restante dos ORFs sendo idênticas (Figura 51). Adicionalmente, P-9PA-3 apresentou 65% de identidade quando comparado a SC1 e SC2, principalmente devido à região de genes precoces.

P9PA3_gp15 demonstrou 89% de similaridade (89% de identidade e cobertura) com a proteína hipotética PJXGC_gp15, enquanto que apresentou 97% de identidade (100% de cobertura) com ORFs das regiões profágicas do tipo C, D e H de FL-Periwinkle e profagos tipo 2 (FP2, SC2 e P-PA19-2). Por outro lado, P9PA3_gp16 não foi encontrada em P-JXGC-3, mas exibiu até 99% de identidade (100% de cobertura) com proteínas hipotéticas relacionadas a profagos dos isolados gxpsy, JRPAMB1, psy62 e UF506, que possuem profagos tipos 1 e 2. Essa ORF mostrou alta similaridade (99% de identidade e cobertura) com base em anotação de função com uma proteína madura do tipo I de proliferação de células T (Figura 51).

Figura 51. Mapa de alinhamento genômico que mostra as semelhanças entre os profagos do isolado 9PA de CLas com SC1 de UF506 e P-JXJC-3 de JXGC.



Genes anotados que compartilham funções idênticas são representados por setas da mesma cor.

Fonte: a autora

5 DISCUSSÃO

Os rascunhos de genomas, também chamados de *drafts*, são ferramentas extremamente úteis para pesquisas iniciais e explorações. No entanto, quando se trata de estudos abrangentes da estrutura genômica, os genomas completos são considerados o padrão-ouro (RICKER et al., 2012). CLas representa uma ameaça significativa para a indústria global de citros e apesar dos muitos impedimentos em estudos com essa bactéria por conta de sua natureza fastidiosa e impossibilidade de cultivo, avanços em sequenciamento do genoma ofereceram luz sobre sua diversidade genética (de PAULA et al. 2019; DING et al. 2009; ISLAM et al. 2012; KATOH et al. 2011; LIU et al. 2011; MATOS et al. 2013; WANG et al. 2015; ZHENG et al. 2016a).

No presente trabalho, obtivemos o genoma circular do primeiro isolado brasileiro de CLas, nomeado como 9PA. Fechamos todos os gaps remanescente de uma montagem prévia usando amplificações por PCR e sequenciamento de Sanger, o que resultou em um genoma completo e circular de 1.231.199 pb. Em uma análise comparativa de genoma inteiro, foram examinadas detalhadamente as paisagens genéticas do isolado 9PA em comparação com 13 genomas completos de CLas, incluindo isolados da China (gxpsy, A4, JXGC, GDCZ, PGD e PYN), Estados Unidos (AHCA1, JRPAMB1 e psy62), Colômbia (CoFLP), França - Ilha Reunião (ReuSP1), Japão (Ishi-1) e Tailândia (TaiYZ2). Nossa análise revelou a presença de oito LCBs, que são regiões do genoma que compartilham sintenia (DARLING et al., 2004). Dois desses LCBs, juntos, constituem 97,6% dos genomas de CLas comparados, indicando uma história evolutiva compartilhada. Isso sugere significância funcional ou pressões seletivas que preservaram estruturas genômicas específicas (KIRCHBERGER; SCHMIDT; OCHMAN, 2020). Como CLas é um patógeno interno obrigatório, a conservação observada dessas estruturas genômicas sugere um papel vital na biologia do patógeno e sua interação com seus hospedeiros. Por outro lado, os seis LCBs restantes estão localizados dentro da região do profago, indicando regiões suscetíveis a rearranjos genéticos e sujeitos a pressões evolutivas impostas por ambientes dinâmicos (KIRCHBERGER; SCHMIDT; OCHMAN, 2020; ZHOU et al., 2013). Este dinamismo provavelmente contribui para as variações observadas entre diferentes isolados: 9.091 *mismatches* e 992 gaps/inserções no total. Apesar disso, os genomas mantiveram uma alta identidade á nível cromossômico, o que significa

que a divergência em termos evolucionários é recente. Isso pode ser observado na árvore filogenética, que sugere apenas 2 grupos divergindo de um ancestral comum. Dentro de um desses grupos principais, um subgrupo compreende predominantemente representantes da Ásia (A4, PGD, GDCZ, TaiYZ2 e JXGC), com um único isolado dos Estados Unidos (AHCA1). Além disso, neste grupo, o representante do Brasil (9PA) parece mais próximo dos isolados dos Estados Unidos JRPAMB1 e psy62. No entanto, é importante ressaltar que a árvore filogenética não reflete exclusivamente as origens geográficas, como exemplificado pelo agrupamento separado de isolados da China (PYN) e França (ReuSP1).

Além dessas comparações genômicas, o presente estudo possibilitou a identificação de seis HGRs que desempenharam um papel crucial na compreensão da dinâmica populacional em isolados brasileiros. A diversidade no perfil dos 68 isolados de campo de CLas examinados fornece informações sobre a variação genética na população de CLas. Embora o isolado 9PA tenha sido escolhido como o haplótipo dominante com base em marcadores SSR (DA SILVA et al., 2019), a análise completa da sequência permitiu uma comparação mais profunda com isolados sequenciados completamente, possibilitando o desenvolvimento e aplicação de comparações genômicas específicas a amostras de campo. Os dados apresentados indicam que pelo menos algumas variações detectadas entre os genomas comparados estão de fato presentes na população de campo de isolados de CLas atualmente. Impressionantes 72% das amostras exibiram perfis A, B ou C, sendo o perfil B o mais predominante, representando 41% dos casos. Em contraste, os 28% restantes das amostras apresentaram 13 perfis distintos variando de D a P. Variações de perfis também foram observadas por WANG et al. (2012) ao estudarem regiões genômicas com hipervariações em isolados da China e Flórida. A presença de tais variações genéticas entre os isolados de CLas de São Paulo pode parecer surpreendente diante de estudos anteriores que sugeriam homogeneidade genética dentro das populações de CLas no Brasil, principalmente utilizando marcadores SSRs e STRs (DA SILVA et al., 2019; DE PAULA et al., 2019). Uma possível explicação para essa divergência é a diferença em resolução e sensibilidade entre os métodos utilizados nesses estudos anteriores e a abordagem de sequenciamento do genoma completo e genômica comparativa empregada em nossa análise. Devido aos SSRs e STRs serem regiões do genoma com taxas de mutação relativamente altas, sua ocorrência é menor em regiões gênicas (VIEIRA et al., 2016). Além disso podem

apresentar um nível relativamente menor de polimorfismo, o que significa que eles podem não ser capazes de detectar todas as diferenças genéticas entre indivíduos ou populações. Dessa forma, esses métodos podem não capturar a diversidade genética em escala mais fina que pode ser observada no nível do genoma inteiro. Nossa análise, por outro lado, fornece uma visão mais abrangente da paisagem genética dos isolados de CLas ao examinar o genoma inteiro, incluindo regiões cromossômicas e de profagos. Essa abordagem nos permite detectar variações genéticas que podem não ser aparentes quando nos concentramos apenas em SSRs e STRs. Uma abordagem necessária seria a comparação de diferentes maneiras de analisar isolados da coleção de campo, levando em consideração também a possibilidade de introduções múltiplas de isolados de CLas em uma única árvore, assim como observado por ZHOU et al. (2013).

Observou-se que 94,1% das amostras avaliadas continham uma região de 2.139 pb, (HGR_2), englobando duas proteínas hipotéticas e uma proteína repressora de fago, que estava ausente no genoma preliminar do isolado 9PA (SILVA et al. 2021). Essa discrepância provavelmente se deve a imprecisões nos dados/montagem do sequenciamento de nova geração, já que a mesma fonte vegetal foi utilizada. Por outro lado, nossas amostras de controle da Flórida e Costa Rica mostraram amplificação de um fragmento de 715 pb, indicando ausência dessa região. Essa divergência sugere potenciais distinções genéticas entre isolados de CLas de diferentes áreas geográficas em relação às proteínas repressoras de fago. Além do HGR_2, o HGR_4 e o HGR_12 também estão em regiões contendo uma proteína repressora de fago. A comparação de sequências não revelou similaridade significativa, apesar da anotação como proteínas repressoras de fago. Isso sugere que elas podem ter sido adquiridas de diferentes tipos de profagos. A importância da proteína repressora de fago está em seu papel essencial nas bactérias, especificamente na regulação da atividade dos fagos. Essa regulação ajuda a manter um equilíbrio delicado entre os ciclos lisogênico e lítico dentro das células hospedeiras, um mecanismo crucial para a sobrevivência bacteriana. A proteína repressora de fago lambda se liga a uma sequência específica no genoma do fago. Essa ligação impede que o fago inicie o ciclo lítico, por outro lado a proteína repressora de fago P22 se liga a um operon no genoma da bactéria. Esse operon codifica genes necessários para o ciclo lítico, desta maneira a ligação da proteína repressora de fago também impede a expressão desses genes (SAUER et al., 1983; KIM et al., 2013).

O profago tipo 1 é identificado por um fragmento de 293 pb (HGR_4), enquanto que a ambiguidade entre o tipo 3 (624 pb) e o tipo 2 (601 pb) pode ser resolvida pela amplificação específica para o HGR_7 de 1.400 pb (profago tipo 1) ou 2.290/2.593 pb (profago tipo 2). Especificamente, o HGR_6 nos ajudou a detectar uma variação de 21 pb dentro de uma proteína de integridade do envelope celular, também anotada como uma putativa Colicina IA (SC1_gp060 no genoma do profago SC1). Já o HGR_7 revelou variações na junção das regiões de genes precoces e genes tardios, incluindo a presença de uma sequência mosaico (número de acesso do GenBank MH733245.1) relatada anteriormente em isolados brasileiros que possuem o profago tipo 1 (Da SILVA et al. 2019) e uma região contendo uma guanilato quinase (SC2_gp230), uma proteína de imunidade à colicina (SC2_gp255) e uma putativa adesina autotransportadora trimérica (SC2_gp240) em SC2. Nosso estudo revelou uma co-ocorrência significativa de ambos os tipos de profagos 1 e 3 em uma grande maioria dos isolados examinados (89,7%), em vez da presença única de um dos tipos 1 ou 3. Esta observação se alinha com as conclusões de CUI et al. (2021) em seu estudo, que se concentrou em amostras originárias da China. A recorrente co-ocorrência desses tipos de profagos em regiões diversas (China e Brasil) sugere um padrão consistente dentro das populações de CLas. Notavelmente, apenas uma pequena fração das amostras (10,3%) apresentou a presença única de profagos tipo 1 ou tipo 3, indicando que pode haver uma preferência ou seleção entre os isolados de CLas brasileiros para abrigar essa combinação de profagos.

Em relação à variação na proteína de integridade do envelope celular ou putativa bacteriocina colicina Ia (HGR_6), essa diferença foi apontada no capítulo 2 deste trabalho, destacando as divergências entre os genes SC1_gp060 de diferentes isolados, notavelmente 2PA, Poona e UF506. Aproximadamente 10,3% dos isolados não apresentaram a variação de 21 pb observada nos isolados-controle da Flórida, Costa Rica e Behai. Essa divergência destaca a baixa heterogeneidade genética presente nesta região entre os isolados de CLas. No caso do HGR_7, observamos um padrão predominante de amplificação de 1.400 pb característico dos profagos tipo 1, mesmo em uma amostra que amplificou apenas um fragmento de 624 pb no HGR_4 (amostra 30), o que significa que mais de um isolado pode estar presente em uma única árvore. Nenhum isolado de campo apresentou padrão de amplificação via PCR de HGR_7 para profagos tipo 2 (2.290 ou 2.593 pb), exceto os isolados-controle Behai, Costa Rica e Flórida. Além disso, duas amostras não apresentaram nenhuma

amplificação em HGR_7, como observado no isolado controle da Índia. Essas variações destacam possíveis disparidades regionais na composição dos profagos de isolados de CLas, como visto na ocorrência de profagos em alguns isolados da China, Índia, Estados Unidos e Paquistão (CUI et al., 2021; DAI et al., 2019; DAS et al., 2021). Ainda, essa observação também pode ser apoiada pelos resultados de GAO et al. (2022), que relataram uma alta densidade de variação na região do profago, com uma estimativa de 23,3 variações por Kb. Vale ressaltar que, sendo considerada junto com a China como provável origem da HLB, a Índia demonstra a necessidade de estudos de diversidade com isolados de CLas, em contraste marcante com a abundância de relatos da China (CHEN et al., 2011, CUI et al., 2021; ISLAM et al., 2012; MA et al., 2014; GAO et al., 2022; TOMIMURA et al., 2009; LIU et al., 2011; TANG et al., 2011).

Caracterizada pela sequência repetitiva AGACACA, a região de VNTR HGR_12 ganhou atenção em estudos genéticos envolvendo isolados de CLas (CHEN et al., 2010; Da SILVA et al., 2019; GOSH et al., 2015). É importante notar que esta região reside dentro de um ORF responsável pela codificação de uma proteína repressora de fago. CHEN et al. (2010) destacaram a ocorrência frequente de AGACACA com cinco repetições em isolados da Flórida. Neste estudo este padrão foi observado em vários isolados, incluindo 9PA, JRPAMB1, psy62 e PYN. A consistência entre esses isolados sugere possíveis assinaturas genéticas regionais dentro das populações de CLas. Nas amostras avaliadas, ressalta-se a alta heterogeneidade genética desta região.

Dentre as regiões estudadas, a HGR_M se destaca por estar ligada a um membro recentemente identificado da família de *Microviridae* de CLas, conforme detalhado no estudo conduzido por ZHANG et al. (2021). Em nossa própria investigação, ao conduzirmos a análise de variabilidade molecular para HGR_M usando concomitantemente os conjuntos de primers LJ1194f/LJ1195r e LJ1240f/LJ1234r e empregando a comparação do genoma, um padrão distinto emergiu. A presença da Região I, abrangendo das bases 1 a 1.719 (ou 91 a 1.547 em relação a 9PA), resultou na amplificação de um fragmento de 333 pb, observado em 100% das amostras analisadas. Curiosamente, quando ambas as Regiões I e II completas estavam presentes, a amplificação gerou fragmentos de 333 pb e 1.333 pb. Notavelmente, no conjunto de isolados 66,2% exibiram a presença simultânea das Regiões I e II, enquanto nenhuma possuía apenas a Região II completa. A diversidade observada nesses HGRs pode ter implicações significativas para a plasticidade do

genoma do CLas. Em seu estudo, ARMSTRONG et al. (2022) relacionaram a menor susceptibilidade ao HLB em toranja à ausência do CLasMV1 nessas plantas e HAO et al (2019) apontaram que um gene de profago que codifica para uma proteína putativa, chamado de LasP₂₃₅, ao ser clonado e expresso em citrus, causou nestas plantas os mesmos sintomas do HLB. Tais resultados indicam que regiões de fagos e *Microvirus* são importantes para a sintomatologia e plasticidade do HLB. Pesquisas adicionais são necessárias para investigar os papéis funcionais das outras regiões hipervariáveis apontadas neste estudo e seu potencial impacto na gravidade do HLB e nas estratégias de manejo desta e outras doenças cítricas.

Nossa análise do genoma do isolado 9PA revelou dois profagos distintos, P-9PA-1 e P-9PA-3. P-9PA-1, caracterizado como um profago tipo 1, exibiu 83% de similaridade genética a SC1, mas também revelou 841 variações genéticas (*mismatches*, gaps e inserções). Notavelmente, certas ORFs de genes tardios dentro de P-9PA-1, como P9PA1_gp01, P9PA1_gp02, P9PA1_gp03 e P9PA1_gp04, exibiram estruturas mosaicas semelhantes às descobertas de estudos anteriores em isolados de CLas do Brasil (Da SILVA et al., 2019). Esta região genética combina elementos dos profagos SC1 e SC2. Além disso, P9PA1_gp17, embora ausente em SC1, apresentou similaridades a um arranjo genético envolvendo uma proteína de junção cabeça-cauda e uma putativa holina. Na região de genes precoces, as ORFs P9PA1_gp20 e P9PA1_gp21 exibiram variações e similaridades com outros profagos. P9PA1_gp20 exibiu 100% de identidade nucleotídica com uma proteína hipotética de P-JXGC-3, e P9PA1_gp21 exibiu até 91% de identidade com uma ORF do tipo D do profago do isolado da Flórida FL-Periwinkle (ZHOU et al., 2013). Em seu trabalho, os autores definiram os tipos com base em regiões de rearranjos e recombinações de profagos encontrados, e ainda correlacionaram essas variações a hospedeiros diferentes (como citrus, psilídeos e vinca) e a divergentes sintomas em citros. Ainda, apontaram que o tipo D foi predominantemente encontrado em laranjeiras-doces em comparação a psilídeos, que continham somente os tipos A, B ou C. Tal observação sugere associação entre os tipos de profagos e seus rearranjos e diferentes hospedeiros e manifestação de sintomas. Por fim, P9PA1_gp40, compartilhou altas similaridades com genes de guanilato quinase de vários isolados de CLas.

No que diz respeito ao profago P-9PA-3, ele manteve uma impressionante identidade geral de sequência de 98% quando comparado ao P-JXGC-3, apesar de algumas variações em ORFs específicas. P9PA3_gp15 mostrou uma considerável

semelhança com uma proteína hipotética do P-JXGC-3 e alinhou-se com ORFs das regiões de profago tipo-C, D e H da Florida (ZHOU et al. 2013), bem como profagos tipo 2 em vários isolados de CLas. Em contraste, P9PA3_gp16, embora ausente em P-JXGC-3, demonstrou alta identidade com proteínas hipotéticas relacionadas a fagos de isolados de CLas que possuem profagos tipo 1 e 2, com similaridades funcionais relacionadas à proliferação de células T maduras. Assim como nossas descobertas, um padrão de configuração foi observado por CUI et al. (2021) ao comparar novos tipos de profagos do Paquistão, P-PA19-1 e P-PA19-2, com outros tipos de profagos tipo 1 e 2 de CLas. Esses padrões de mosaico sugerem trocas genéticas e rearranjos, refletindo possivelmente a natureza dinâmica dos genomas de profagos (DION et al. 2020; HENDRIX et al. 1999).

Nossa análise abrangente do genoma do CLas, com foco nas características únicas do isolado 9PA em comparação com outros genomas completos, proporcionou *insights* valiosos sobre a diversidade desse patógeno cítrico devastador responsável pela HLB. Além disso, identificamos perfis genéticos distintos entre as amostras de campo analisadas, sendo que o isolado 9PA se alinha a um dos perfis representativos, destacando a complexidade genética dentro da população de CLas no Brasil. De forma importante, a presença de elementos de profagos distintos entre os isolados, incluindo repetições de proteínas repressoras de fagos, pode desempenhar papéis cruciais na sobrevivência e virulência de CLas, em conformidade com pesquisas anteriores que enfatizam a importância de elementos relacionados a fagos na biologia e plasticidade deste patógeno com relação a seus hospedeiros (BAO et al., 2021; HAO, et al., 2019; ZHANG et al., 2021; ZHOU et al., 2013). Em resumo, nossas descobertas lançam luz sobre a diversidade molecular e a dinâmica de CLas, fornecendo informações para avaliação da evolução dos isolados de campo no Brasil, bem como o que considerar ao desenvolver estratégias direcionadas para o controle dessas bactérias. Ao desvendar mistérios genéticos desse patógeno cítrico destrutivo, damos passos significativos para incrementar pesquisas que visam encontrar soluções para proteger a indústria global de citros do impacto devastador da HLB.

6 CONCLUSÕES

- O genoma do isolado brasileiro de CLas 9PA foi obtido com sucesso;
- O profago P-9PA-1 se encontra nas formas integrado ao genoma de 9PA e circular, enquanto que P-9PA-3, possivelmente se encontra somente na forma circular;
- Os 13 genomas de CLas comparados com 9PA mostraram alta porcentagem de identidade a nível cromossômico, enquanto que a região dos profagos revela maiores divergências;
- A comparação filogenética mostrou que 9PA se equipara as origens genéticas de isolados provenientes das américas (EUA e Colômbia) e da Ásia (China);
- Existe uma diversidade de perfis entre isolados brasileiros com base nos seis HGRs estudados. No entanto 9PA se enquadra no segundo perfil mais encontrado, configurando-se como um isolado representativo do Brasil.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADKAR-PURUSHOTHAMA, C. R.; QUAGLINO, F.; CASATI, P.; RAMANAYAKA, J. G.; BIANCO, P. A. Genetic diversity among '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' isolates based on single nucleotide polymorphisms in 16S rRNA and ribosomal protein genes. *Annals of Microbiology*, v. 59, p. 681–688, 2009. DOI: 10.1007/BF03175122
- AHMAD, K. M.; SIJAM, K.; HASHIM, H.; KADIR, J.; RASTAN, S. O. S. Characterization of *Candidatus Liberibacter asiaticus* isolated from *Citrus grandis* and *Citrus reticulata* based on 16S rDNA and outer membrane protein (OMP) genes. *International Journal of Agriculture & Biology*, v. 11, p. 401–407, 2009.
- ARMSTRONG, C. M.; ZHOU, L.; LUO, W.; BATUMAN, O.; ALABI, A. J.; DUAN, Y. Identification of a chromosomal deletion mutation and the dynamics of two major populations of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in its hosts. *Phytopathology*, v. 112, n. 1, p. 81-88, 2022.
- BASSANEZI, R. B.; LOPES, A. S.; DE MIRANDA, M. P.; et al. Overview of citrus huanglongbing spread and management strategies in Brazil. *Trop. Plant Pathol.*, v. 45, p. 251–264, 2020. DOI: 10.1007/s40858-020-00343-y
- 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, n. 11, p. 6473-6478, nov. 2005. DOI: 10.1128/AEM.71.11.6473-6478.2005.
- BOVÉ, J. M. A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, v. 88, p. 7-37, 2006.
- 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. DOI: 10.1094/PHYTO-100-6-0567.
- CHEN, Y.; BENDIX, C.; LEWIS, J. D. Comparative genomics screen identifies microbe-associated molecular patterns from '*Candidatus Liberibacter*' spp. that elicit immune responses in plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 33, p. 539–552, 2020. DOI: 10.1094/MPMI-11-19-0309-R.
- COLETTA-FILHO, H. D.; TARGON, M. L. P. N.; TAKITA, M. A.; DE NEGRI, J. D.; POMPEU JUNIOR, J.; MACHADO, M. A. First report of the causal agent of Huanglongbing ('*Candidatus Liberibacter asiaticus*') in Brazil. *Plant Disease*, v. 88, p. 1382, 2004.
- CUI, X.; LIU, K.; ATTA, S.; ZENG, C.; ZHOU, C.; WANG, X. Two unique prophages of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' strains from Pakistan. *Phytopathology*, v. 111, n. 5, p. 784-788, 2021. DOI: 10.1094/PHYTO-10-20-0454-SC.

- CUI, X.; LIU, K.; HUANG, J.; FU, S.; CHEN, Q.; LIU, X.; ZHOU, C.; WANG, X. Population Diversity of *Candidatus Liberibacter asiaticus* and *Diaphorina citri* in Sichuan: A case study for huanglongbing monitoring and interception. *Plant Disease*, v. 106, n. 6, 2022. DOI: 10.1094/PDIS-07-21-1539-RE.
- DA GRAÇA, J. V.; DOUHAN, G. W.; HALBERT, S. E.; KEREMANE, M. L.; LEE, R. F.; VIDALAKIS, G.; ZHAO, H. Huanglongbing: an overview of a complex pathosystem ravaging the world's citrus. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 58, p. 373-387, 2016.
- DARLING, A. C.; MAU, B.; BLATTNER, F. R.; PERNA, N. T. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Research*, v. 14, n. 7, p. 1394-1403, jul. 2004. DOI: 10.1101/gr.2289704.
- DAS, A. K.; CHICHGHARE, S. A.; SHARMA, S. K. et al. Genetic diversity and population structure of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' associated with citrus Huanglongbing in India based on the prophage types. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 37, p. 95, 2021. DOI: 10.1007/s11274-021-03057-8.
- DA SILVA, P. A.; FASSINI, C. G.; SAMPAIO, L. S.; DEQUIGIOVANNI, G.; ZUCCHI, M. I.; WULFF, N. A. Genetic diversity of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' revealed by short tandem repeats and prophage typing indicates population homogeneity in Brazil. *Phytopathology*, v. 109, p. 960-971, 2019.
- DE PAULA, L. B.; LIN, H.; STUCHI, E. S. et al. Genetic diversity of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in Brazil analyzed in different geographic regions and citrus varieties. *European Journal of Plant Pathology*, v. 154, p. 863–872, 2019. DOI: 10.1007/s10658-019-01695-1.
- DENG, X.; LOPES, S.; WANG, X.; SUN, X.; JONES, D.; IREY, M.; CIVEROLO, E.; CHEN, J. Characterization of *Candidatus Liberibacter asiaticus* populations by double-locus analyses. *Current Microbiology*, v. 69, n. 5, p. 554–560, 2014. DOI: 10.1007/s00284-014-0621-9.
- DING, F.; DENG, X.; HONG, N.; ZHONG, Y.; WANG, G.; YI, G. Phylogenetic analysis of the citrus Huanglongbing (HLB) bacterium based on the sequences of 16S rDNA and 16S/23S rDNA intergenic regions among isolates in China. *European Journal of Plant Pathology*, v. 124, p. 495–503, 2009. DOI: 10.1007/s10658-009-9436-0.
- DION, M. B.; OECHSLIN, F.; MOINEAU, S. Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews Microbiology*, v. 18, p. 125-138, 2020. DOI: 10.1038/s41579-019-0311-5.
- DOMINGUEZ-MIRAZO, M.; JIN, R.; WEITZ, J. S. Functional and comparative genomic analysis of integrated prophage-like sequences in "*Candidatus Liberibacter asiaticus*". *mSphere*, v. 4, n. 6, e00409-19, nov. 2019. DOI: 10.1128/mSphere.00409-19.

- DU, J.; WANG, Q.; SHI, H.; ZHOU, C.; HE, J.; WANG, X. A prophage-encoded effector from *Candidatus Liberibacter asiaticus* targets ASCORBATE PEROXIDASE6 in citrus to facilitate bacterial infection. *Molecular Plant Pathology*, v. 24, p. 302–316, 2023. DOI: 10.1111/mpp.13296.
- DUAN, Y.; ZHOU, L.; 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, p. 1011–1020, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-8-1011>
- FLEITES, L. A.; JAIN, M.; ZHANG, S.; GABRIEL, D. W. "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" prophage late genes may limit host range and culturability. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 80, n. 19, p. 6023-6030, out. 2014. DOI: 10.1128/AEM.01958-14.
- FU, S.; BAI, Z.; SU, H.; LIU, J.; HARTUNG, J. S.; ZHOU, C.; WANG, X. Occurrence of prophage and historical perspectives associated with the dissemination of huanglongbing in mainland China. *Plant Pathology*, v. 69, p. 132-138, 2020. DOI: 10.1111/ppa.13100.
- GAO, F.; WU, B.; ZOU, C.; BAO, Y.; LI, D.; YAO, W.; POWELL, C. A.; ZHANG, M. Genetic diversity of "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" based on four hypervariable genomic regions in China. *Microbiology Spectrum*, v. 10, n. 6, e0262222, dez. 2022. DOI: 10.1128/spectrum.02622-22.
- GHOSH, D. K.; BHOSE, S.; MOTGHARE, M.; WARGHANE, A.; MUKHERJEE, K.; GHOSH, D. K. Sr.; SHARMA, A. K.; LADANIYA, M. S.; GOWDA, S. Genetic diversity of the Indian populations of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' based on the tandem repeat variability in a genomic locus. *Phytopathology*, v. 105, n. 8, p. 1043-1049, ago. 2015. DOI: 10.1094/PHYTO-09-14-0253-R.
- GUPTA, K. N.; BARANWAL, V. K.; HAQ, Q. M. Sequence analysis and comparison of 16S rRNA, 23S rRNA, and 16S/23S intergenic spacer region of greening bacterium associated with yellowing disease (huanglongbing) of kinnow mandarin. *Indian Journal of Microbiology*, v. 52, n. 1, p. 13-21, 2012. DOI: 10.1007/s12088-011-0113-6.
- HAO, G.; AMMAR, D.; DUAN, Y.; STOVER, E. Transgenic citrus plants expressing a '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' prophage protein LasP235 display Huanglongbing-like symptoms. *Agri Gene*, v. 12, 2019
- HENDRIX, R. W.; SMITH, M. C. M.; BURNS, R. N.; FORD, M. E.; HATFULL, G. F. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: All the world's a phage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 96, n. 5, p. 2192-2197, fev. 1999. DOI: 10.1073/pnas.96.5.2192.
- HOCQUELLET, A.; TOORAWA, P.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. Detection and identification of the two *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus

- huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the β operon. *Molecular and Cellular Probes*, v. 13, p. 373-379, 1999.
- HU, W. Z.; WANG, X. F.; ZHOU, Y.; LI, Z. A.; TANG, K. Z.; ZHOU, C. Y. Diversity of the OMP Gene in *Candidatus Liberibacter asiaticus* in China. *Journal of Plant Pathology*, v. 93, n. 1, p. 211–214, 2011.
- ISLAM, M. S.; GLYNN, J. M.; BAI, Y.; DUAN, Y. P.; 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, n. 39, 2012. DOI: 10.1186/1471-218
- JAGOEIX, S.; BOVE, J. M.; GARNIER, M. The phloem-limited bacterium of the greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 44, p. 379–386, 1994.
- JAIN, M.; FLEITES, L. A.; GABRIEL, D. W. Prophage-encoded peroxidase in ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ is a secreted effector that suppresses plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 28, n. 12, p. 1330-1337, dez. 2015. DOI: 10.1094/MPMI-07-15-0145-R.
- KATOH, H.; DAVIS, R.; SMITH, M. W.; WEINERT, M.; IWANAMI, T. Differentiation of Indian, East Timorese, Papuan and Floridian *Candidatus Liberibacter asiaticus* isolates on the basis of simple sequence repeat and single nucleotide polymorphism profiles at 25 loci. *Annals of Applied Biology*, v. 160, n. 3, p. 291-297, 2012. ISSN: 0003-4746.
- 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, n. 9, e106109, set. 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0106109.
- KATOH, H.; SUBANDIYAH, S.; TOMIMURA, K.; OKUDA, M.; SU, H. J.; IWANAMI, T. Differentiation of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” isolates by variable-number tandem-repeat analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, p. 1910–1917, 2011. DOI: 10.1128/AEM.01571-10.
- KIM, M.; RYU, S. Antirepression system associated with the life cycle switch in the temperate Podoviridae phage SPC32H. *Journal of Virology*, v. 87, n. 21, p. 11775-11786, nov. 2013. DOI: 10.1128/JVI.02173-13.
- LI, W.; HARTUNG, J. S.; LEVY, L. Quantitative real-time PCR detection and quantification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods*, v. 66, p. 104-115, 2006. DOI: 10.1016/j.mimet.2005.10.018.
- LIU, R.; ZHANG, P.; PU, X.; XING, X.; CHEN, J.; DENG, X. Analysis of a prophage gene frequency revealed population variation of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” from two citrus-growing provinces in China. *Plant Disease*, v. 95, p. 431–435, 2011. DOI: 10.1094/PDIS-04-10-0300.

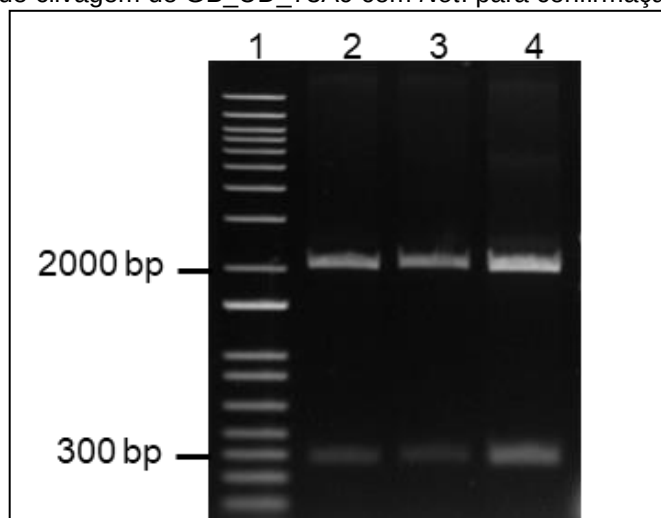
- LIU, X.; FAN, Y.; ZHANG, C.; DAI, M.; WANG, X.; LI, W. Nuclear import of a secreted "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" protein is temperature dependent and contributes to pathogenicity in *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 1684, jul. 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01684.
- 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, n. 11, e78994, nov. 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0078994.
- NARDI, A.; CORDA, Y.; BATY, D.; DUCHÉ, D. Colicin A immunity protein interacts with the hydrophobic helical hairpin of the colicin A channel domain in the *Escherichia coli* inner membrane. *Journal of Bacteriology*, v. 183, n. 22, p. 6721-6725, nov. 2001. DOI: 10.1128/JB.183.22.6721-6725.2001.
- PUTTAMUK, T.; ZHOU, L.; THAVEECHAI, N.; ZHANG, S.; ARMSTRONG, C. M.; DUAN, Y. Genetic diversity of *Candidatus Liberibacter asiaticus* based on two hypervariable effector genes in Thailand. *PLoS ONE*, v. 9, n. 12, e112968, dez. 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0112968.
- RICKER, N.; QIAN, H.; FULTHORPE, R. R. The limitations of draft assemblies for understanding prokaryotic adaptation and evolution. *Genomics*, v. 100, n. 3, p. 167-175, set. 2012. DOI: 10.1016/j.ygeno.2012.06.009.
- REINKING, O. A. Diseases of economic plants in South China. *Philippine Agriculturist*, v. 8, p. 109-135, 1919.
- ROUX, S.; KRUPOVIC, M.; POULET, A.; DEBROAS, D.; ENAULT, F. Evolution and diversity of the Microviridae viral family through a collection of 81 new complete genomes assembled from virome reads. *PLoS ONE*, v. 7, n. 7, e40418, jul. 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0040418. PMCID: PMC3394797.
- SAUER, R. T.; NELSON, H. C. M.; HEHIR, K.; HECHT, M. H.; GIMBLE, F. S.; DEANDA, J.; POTEETE, A. R. The Lambda and P22 Phage Repressors. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 1, n. 4, p. 1011-1022, 1983. DOI: 10.1080/07391102.1983.10507499.
- SILVA, P. A.; HUANG, J.; WULFF, N. A.; ZHENG, Z.; KRUGNER, R.; CHEN, J. Genome sequence resource of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' strain 9PA from Brazil. *Plant Disease*, v. 105, n. 1, p. 199-201, 2021. DOI: 10.1094/PDIS-05-20-1018-A.
- TANG, K. Z.; HU, W. Z.; LI, Z. A.; ZHOU, Y.; WANG, X. F. Diversity of the OMP Gene in *Candidatus Liberibacter asiaticus* in China. *Journal of Plant Pathology: Rivista di Patologia Vegetale*, v. 93, n. 1, p. 211-214, 2011. DOI: 10.1400/169615.

- TEIXEIRA, D. C.; EVEILLARD, S.; SIRAND-PUGNET, P.; WULFF, N. A.; SAILLARD, C.; et al. The *tufB*-*secE*-*nusG*-*rplKAJL*-*rpoB* gene cluster of the liberibacters: sequence comparisons, phylogeny and speciation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 58, p. 1414–1421, 2008.
- TEIXEIRA, D.; DANET, J. L.; EVEILLARD, S.; CRISTINA MARTINS, E.; DE JESUS JUNIOR, W. C.; TAKAO YAMAMOTO, P.; APARECIDO LOPES, S.; BEOZZO BASSANEZI, R.; JULIANO AYRES, A.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J. M. Citrus huanglongbing in Sao Paulo State, Brazil: PCR detection of the “*Candidatus Liberibacter*” species associated with the disease. *Molecular and Cellular Probes*, v. 19, p. 173–179, 2005.
- TOMIMURA, K.; MIYATA, S.-I.; FURUYA, N.; KUBOTA, K.; OKUDA, M.; SUBANDIYAH, S.; HUNG, T.-H.; SU, H.-J.; IWANAMI, T. Evaluation of genetic diversity among ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ isolates collected in Southeast Asia. *Phytopathology*, v. 99, p. 1062–1069, 2009. DOI: 10.1094/PHYTO-99-9-1062.
- THAPA, S. P.; DE FRANCESCO, A.; TRINH, J.; GURUNG, F. B.; PANG, Z.; VIDALAKIS, G.; WANG, N.; ANCONA, V.; MA, W.; COAKER, G. Genome-wide analyses of *Liberibacter* species provide insights into evolution, phylogenetic relationships, and virulence factors. *Molecular Plant Pathology*, v. 21, n. 5, p. 716–731, 2020. DOI: 10.1111/mpp.12925.
- VIEIRA, M. L.; SANTINI, L.; DINIZ, A. L.; MUNHOZ, C. F. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, v. 39, n. 3, p. 312–328, 2016. DOI: 10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027.
- WANG, X.; SU, H.; HUANG, L.; DENG, X.; CHEN, J.; ZHOU, C.; LI, Z. Identification of a novel 1033-nucleotide deletion polymorphism in the prophage region of *Candidatus Liberibacter asiaticus*: potential applications for bacterial epidemiology. *Journal of Phytopathology*, v. 163, p. 681–685, 2015. DOI: 10.1111/jph.12307.
- WANG, X.; ZHOU, C.; DENG, X.; SU, H.; CHEN, J. Molecular characterization of a mosaic locus in the genome of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*.’ *BMC Microbiology*, v. 12, n. 18, 2012. DOI: 10.1186/1471-2180-12-18.
- XU, L.; MO, K.; RAN, D.; MA, J.; ZHANG, L.; SUN, Y.; LONG, Q.; JIANG, G.; ZHAO, X.; ZOU, X. An endolysin gene from *Candidatus Liberibacter asiaticus* confers dual resistance to huanglongbing and citrus canker. *Horticulture Research*, v. 10, n. 9, 2023. DOI: 10.1093/hr/uhad159.
- ZHANG, L.; LI, Z.; BAO, M.; LI, T.; FANG, F.; ZHENG, Y.; LIU, Y.; XU, M.; CHEN, J.; DENG, X.; ZHENG, Z. A novel microviridae phage (CLasMV1) from “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 754245, 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2021.754245.

- ZHANG, S.; FLORES-CRUZ, Z.; ZHOU, L.; KANG, B. H.; FLEITES, L. A.; GOOCH, M. D.; WULFF, N. A.; DAVIS, M. J.; DUAN, Y. P.; GABRIEL, D. W. Ca. *Liberibacter asiaticus* carries an excision plasmid prophage and a chromosomally integrated prophage that becomes lytic in plant infections. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 24, n. 4, p. 458-468, 2011. DOI: 10.1094.
- ZHENG, Z.; BAO, M.; WU, F.; VAN HORN, C.; CHEN, J.; DENG, X. A Type 3 Prophage of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' carrying a restriction-modification system. *Phytopathology*, v. 108, n. 4, p. 454-461, 2018. DOI: 10.1094/PHYTO-08-17-0282-R.
- ZHENG, Z.; WU, F.; KUMAGAI, L.; POLEK, M.; DENG, X.; CHEN, J. Two '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' strains recently found in California harbor different prophages. *Phytopathology*, v. 107, p. 662-668, 2017. DOI: 10.1094/PHYTO-10-16-0385-R.
- ZHENG, Z.; BAO, M.; WU, F.; CHEN, J.; DENG, X. Predominance of single prophage carrying a CRISPR/cas system in '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' strains in southern China. *PLOS One*, v. 11, e0146422, 2016a. DOI: 10.1371/journal.pone.0146422.
- ZHENG, Z.; XU, M.; BAO, M.; WU, F.; CHEN, J.; DENG, X. Unusual five copies and dual forms of *nrdB* in "*Candidatus Liberibacter asiaticus*": biological implications and PCR detection application. *Scientific Reports*, v. 6, p. 39020, 2016b. DOI: 10.1038/srep39020.
- ZHOU, L. J.; POWELL, C. A.; HOFFMAN, M. T.; LI, W. B.; FAN, G. C.; et al. 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, p. 6663–6673, 2011.
- ZHOU, L.; POWELL, C. A.; LI, W.; IREY, M.; DUAN, Y. Prophage-mediated dynamics of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' populations, the destructive bacterial pathogens of citrus huanglongbing. *PLOS ONE*, v. 8, n. 12, e82248, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0082248.

APÊNDICES

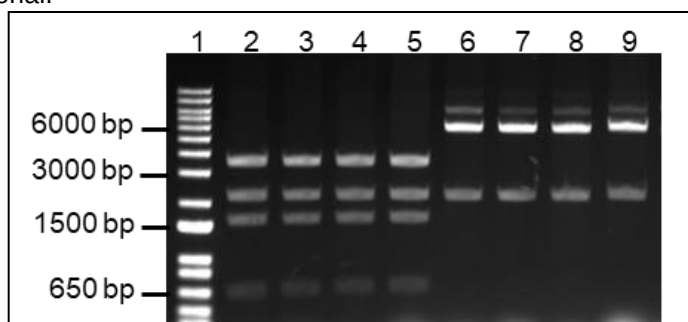
APÊNDICE A – Perfil de clivagem de GB_UD_73A9 com *NotI* para confirmação de domesticação.



A clivagem com a enzima *NotI* resultou em fragmentos de 2.046 bp e 369 bp (canaletas 2 a 4). A canaleta 1 refere-se ao marcador Molecular 1kb plus (Thermo Fisher Scientific)

Fonte: a autora

APÊNDICE B – Perfil de clivagem de GB_UA_4357 com *DraI* e *PvuI* para confirmação de obtenção da unidade transcricional.



A clivagem com a enzima *DraI* resultou em fragmentos de 3.610 bp, 2.243 bp, 1.624 bp e 647 bp (canaletas 2 a 5) enquanto que a clivagem com *PvuI* resultou em 5.934 bp e 2.190 bp (canaletas 6 a 9). A canaleta 1 refere-se ao marcador Molecular 1kb plus (Thermo Fisher Scientific)

Fonte: a autora

APÊNDICE C – Conjunto de primers utilizados para o fechamento do genoma de 9PA via PCR.

Primer	Sequencia	Tamanho do fragment (bp)	ID do gap
42f_9PA	AATCCGTGCGATAGCATTTTC	2710	1
44r_9PA	GGAATGCCAAATTTATCTTCTTTT		
44f_9PA	TACCAGCTGCTGCGATCATA	1252	2A
45r_9PA	TTTTTCAGTTCCACGCAAGA		
45f_9PA	GGCAATATGCCTGCTTTTCAT	447	2B
46r_9PA	TTCTCCTATCGCGAGCATTT		
46f_9PA	AACCCTAGCTGCGACCATAA	1994	3
47r_9PA	GCTTTAAAACAAGCGGCTCA		
47f_9PA	CGCCCTCCTCAAATAACAC	414	4A
48r_9PA	TGATTTGCATTCCCTCGATT		
48f_9PA	TCTATTTTGCGGTGTATGCAA	392	4B
49r_9PA	GGTACCTGATGACTTCACACGA		
49f_9PA	TCTGTAAAGCAAATAGCGCTTAATA	4752	5
53r_9PA	GGATCAACGAGTTGCAAAAA		
53f_9PA	TCGAAACCATATTACTTGAATAGGAA	406	6
54r_9PA	TGTTGCTGCAGGATTAGCTG		
54f_9PA	GAAGCACCTGAGGAACAAGC	420	7
55r_9PA	TTTTGACACCCCACAAGTCA		
55f_9PA	GCAAAACCAATGGAAGACGCT	2150	8
56r_9PA	TTACCCATCCATCAGCAGCC		
56f_9PA	GACCTGTTCACTATATCCCGAAG	4878	9
58r_9PA	TGGAATAGATGGCAGCTAA		
58f_9PA	AGCTGAGCTATCTGGGCATT	492	10
59r_9PA	CGCATATCACTTGGGGATAAA		
59f_9PA	CACCCAACAGCTAGCACTCA	2858	11
60r_9PA	CTGGTGATGGGCAGGTAAGT		
60f_9PA	TGAAGGTGATTCTGCTGGTG	872	12A
61r_9PA	GAACAAGGGCCTGTTATTTTT		
61f_9PA	TGAAATTTTTCCTTTTCGGATTC	431	12B
62r_9PA	CGCGAAATTTTCTCATCACA		
62f_9PA	TTCATGTGCACGGTGGTATT	1314	13
63r_9PA	AACACGTCCCATCAAACCAT		
63f_9PA	TCAGAGTTTGGAAGAGCTTTGAG	5498	14
65r_9PA	TTCCAAATTCATTGGCGATT		
65f_9PA	TGATTCTTTGGGTGCATTGA	1243	15A
66r_9PA	CTATCCGTTCCGGTGCAAAC		
66f2_9PA	TGATGGAGCTGTTTTGGCAA	2525	15B2
68r2_9PA	ACAGGAAGACACATGCACCT		

68f_9PA	GGGGTCATTGTAGCAAAACG		
70r_9PA	ACAATGCCAAAACATCATGC	1826	16
70f_9PA	GAGTCCGTTGATGTTTTGGTT		
72r_9PA	TCCACTATCCTCTTTGCAAAATC	2186	17
72f_9PA	TGTGGCATTCTGTTGTTTCT		
73r_9PA	CGGTTGAACCATGTGCTATG	1266	18
73f_9PA	TCAGCGAAGTATTTCACTTCCAA		
74r_9PA	ATAGCAAGTGGGAAGACGCG	1135	19A
74f_9PA	GGATTGAATGCCTAGGAGAGAG		
77r_9PA	CTTTAGACGAAACGCGATCA	3807	19B
77f_9PA	ACTGCTGAAGGTGCAAGGTT		
78r_9PA	GAGCAGCATGAAGAAATGGCT	2985	20
78f_9PA	TACGCGCTATTGTTGCAAGT		
79r_9PA	AAGTGGCGCAAAGAACAATC	1881	21A
79f2_9PA	ACACACTGCCATTCCCAATACA		
80r2_9PA	ACAGGTATTATTCTCACCCGCA	986	21B
80f_9PA	TCTTGATCCTGATACGAAATTCAA		
82r_9PA	TCTCCGACAACTGTTCTAACGA	3685	22
82f_9PA	TCGCTAAATCCCGTTTTCTC		
83r_9PA	TCCTTCAGCAATTCCAGGAC	505	23
83f_9PA	CAGGACAAATGATGATGCGACA		
84r_9PA	TGCACCGCAAATACAGCAA	5478	24
84f_9PA	GAACACACTTCATGTTCTTCCTTTT		
86r_9PA	GCGAGCTAAACAACGAAAGC	5415	25
86f_9PA	ACGATGTCCATCCATTTTCC		
88r_9PA	CTGGCGTTACACGATCAAAA	1477	26
88f_9PA	AGGGGGTTCATGAAAACCTCTCC		
89r_9PA	TTTAATTTCTCTACTCTTCGTTG	1425	27
89f_9PA	AGAGCACGTTTTTGAGGATCA		
91r_9PA	GGAGAAACCGTTAGCAAAGC	1826	28
91f_9PA	CCATCTGGTCCCCAAGCTTT		
94r_9PA	AAGGCTCCTGAGACAGTCGT	4322	36
94f_9PA	AGCATTACTAGTGACATGGGT		
96r_9PA	TGCTCATTGAACTTGAGGGGA	3954	37
96f_9PA	AGTGCGCAATCGTTCTAGCA		
97r_9PA	CGTGCCACTAATCCCATGGG	1474	38A
97f_9PA	ATGAAGGATCGGCGATCGGT		
175r2_m9PA	TCCCTCATATCCTTTTCTGCCT	2322	38B
175f_m9PA	AGATTTTCGTTCAAGCACATGGT		
98r_9PA	TCGCCTAACTCAGAAGGAAGT	2042	38C
175f_m9PA	AGATTTTCGTTCAAGCACATGGT		
98r_9PA	TCGCCTAACTCAGAAGGAAGT	1907	39

98f_9PA	TGCTGTTGTAGATTTGCGACG		
99r_9PA	ACGACAAATAGAAGCACGTGC	477	40
99f_9PA	CCTCGTCCTTATTGGGTGTCA		
101r_9PA	GGCCCTGCTTGTGAAAATCA	3440	41
101f_9PA	GGATAGCTTGGCAATCTATCGG		
103r_9PA	GGATACCGCCCCCTATTGTCA	3278	42
103f2_9PA	GGTCTTCCAGCAATGTGAAGGT		
190r_m9PA	AGACCACAAACACTGCGCAA	3302	43A
105r_9PA	ACTACCGTCTTGTGGTGTGT		
190f_m9PA	CTGCCCCGTCCAGTCTCTACA	1414	43B
105f_9PA	TGTGTGAACAAAGAACAGGCG		
107r_9PA	GAAAGACGAAACGCTTGCGA	3457	44
107f_9PA	GCCACGTGATGTTACCTTGC		
109r_9PA	TCCTTCTTTTTGTGACCGAACT	4838	45
109f_9PA	TGCCAAATGCTAATGACGATGT		
110r_9PA	AACGTCCCATCAGAACCG	569	46A
110f2_9PA	GTAGCTATAGATGATACACC		
111r_9PA	GGCGATGATGTGCAAAACCT	897	46B
111f_9PA	TGGCGACTATACAGCTCTATGA		
113r_9PA	CGTGCTGATTATGACCAGGGA	4328	47
113f_9PA	GGGCGTTGTTTGCATGAGTT		
116r_9PA	GCCAGATCTAGCGGGAATTCC	5732	48
115f_9PA	TCCCAAGGGCTAATAACTTGCA		
117r_9PA	TGAATCAGCATCACGAAGACAA	2708	49
49_1f_9PA	CCCGATCGGATTTGGTAAA		
49_1r_9PA	GACTCTATCCAGAATCTTTATGTTC	1500	49-1
49_1f_9PA	CGTAGAGATGCAACGGCTATC		
49_1r_9PA	TCCTTTAGTGCCGTGAGATTG	1500	49-2
119f_9PA	ACGAATTGCGAGAGAACGGT		
121r_9PA	ACCTAGCCTCTCGAAAACGA	3061	50
120f_9PA	ACACCTTTCCCAACTGTTCTT		
123r_9PA	CTGAAACAACCTGCTGAAGACGA	5061	51
123f_9PA	GTCAATTTGTTCCGTGATTGCA		
125r_9PA	AACCAACTGAGCTACACCCG	4250	52
125f_9PA	TTGTTGGGGGCAGATGAGTT		
126r_9PA	TGCGATCCATAAGCAAAACGT	638	53A
126f_9PA	GCAATATGCGTATCCTCTCGAA		
127r_9PA	GCACATGAGCATTGGGTAGC	3203	53B
127f_9PA	TGCAACCGCGTTTGTGAATT		
235r_m9PA	TCACACGCTTCAATGGTCGA	5978	54
54_1f_9PA	TGTTTCGTATTCAACTGGGTAGAG		
54_1r_9PA	CTTAGCAAGCAGCGTGAATTT	1500	54-1

54_2f_9PA	TCTGGTGGACCTGTTGTTATG		
54_2r_9PA	ACCATTCGCCAACTATCCTATAC	1630	54-2
130f2_9PA	GCAATTTAGCGCGATTTCTCTGA		
131r_9PA	CCGTAAAAACACAACCTCTCACC	1013	55A2
131f3_9PA	GAGTTGAAATTTTTGCTACGCG		
133r_9PA	TGACCACTACAGGCAGAGGA	1299	55B2
134r_9PA	TGCTGAAAACCTTAGAGCGTGT		
133f_9PA	TCTTCTCCCATAACAGCCGAGA	1141	56A
134f2_9PA	ATATTGGTATGGTAGCGCGTG		
135r2_9PA	AGTCCGTTTACCCTCTTTTTCA	1299	56B2
135f2_9PA	CCCATTGCAAATACTGGAGCA		
136r_9PA	TTCATTTGGACGGCGAACAC	1467	57A
136f2_9PA	TGGTTGAAAATCGGCAATGAAG		
138r2_9PA	GCGTATCTTGATCCGGAGAAAA	3069	57B2
138f_9PA	GTAAAGGGGCAAGGCGATCC		
139r3_9PA	ACGCGCAATGTTCATTTTCTT	1620	58A2
139f_9PA	ATACAGTAAGATATAACATA		
140r_9PA	TCGTCTTCCAAGAAGCATGCC	854	58B
140f_9PA	TGTGAGGTGCATTGCTGGTC		
142r_9PA	GTCAATGGCCTAAGACGCGT	2364	59
142f_9PA	TGGTGGTTATGTAGATGCTCGT		
259r_m9PA	AGCTGTGGGGATTAAACGCA	2068	60
259f_m9PA	GCGTGCTAAAGGGGCAGTAA		
261r_m9PA	AACGTACAATATGCTTGCCGGA	462	61A
259f3_m9PA	AGCCGACATTATCCACATCACA		
144r2_9PA	ACCACGCGTGCACTTTTTT	1228	61B2
144f2_9PA	AGTTCCACGGCATGTTGAAG		
145r_9PA	CCTCGTGGCGGAATGGTTAC	2440	61C2
145f_9PA	TGAGCATGCATCGTCTCAGT		
146r2_9PA	ACCAGCATGATCCGTTCTCTG	1408	62A
146f_9PA	GAGGCGTATCAAAAGTGCATGT		
147r_9PA	CACGTCCAAATCCCCTCACG	4096	63
147f_9PA	CCTTTGGCAGCATGTAAAGTCA		
148r_9PA	AAAGTTGTGATTTTCGGCGGA	2200	64A
148f_9PA	CACTGACTAGGCAGCGAGAA		
277r_m9PA	ACAGACGACTCCATAACGTCA	1520	64B
278r_m9PA	AACGATCCTCATCCTGCTCT		
277f_m9PA	TGACGTTATGGAGTCGTCTGT	815	65A
279r_m9PA	GATGGTCGTGGTCTCTTTGCA		
278f_m9PA	TGCGCAGTGAGAATTTTCGAG	397	65B
279f_m9PA	TGCAAAGAGACCACGACCATC		
152r_9PA	CACCAGTTGCTATCCTCGAGG	3755	66

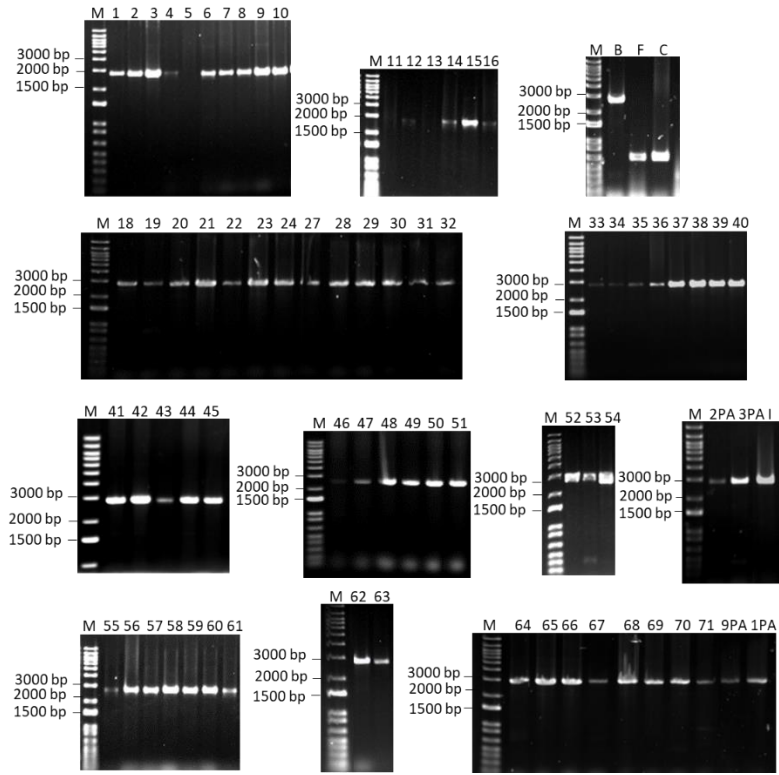
152f_9PA	GCACGAATAGCAACAAAACCCA	3350	67
153r_9PA	GCGACAATTCTCAATGCAAGCA		
153f2_9PA	ACTCAAGACATCATCGCGTGT	1493	68
154r2_9PA	AGTACTGATCTCCTCCTTGTGG		
154f_9PA	CACTTAATCGCTTTCCTCTGGA	779	69A
155r_9PA	TGTCTGAACAGGAAGGAGTCT		
155f_9PA	TCAAGTTTTTTAGGATGATT	2494	69B2
289r3_m9PA	ATACCAAAGTAGCGCATGAAGT		
289f_m9PA	TCGCCTTGGCAGCATAGAGA	4735	70
158r_9PA	CTTCCTGTGGTTGTGCTGGT		
158f_9PA	TCGTTCTTGCCCAATACCTACA	4391	71
160r_9PA	CGCCTCCGCCTTATTCTTCA		
160f_9PA	TCAAGGAGGTGATGGTCCCC	1246	72A
161r_9PA	TCTGCTCAATCAAGTATGCCGA		
161f_9PA	CCAGGCGGTCCAATCATGATC	4072	72B
162r_9PA	GTTGTTACATAGTGGCAGTGCA		
162f_9PA	GGTCCTATGGTTCTTGATGGGC	3918	73
164r_9PA	ACCACACCCTTAGCAACTGG		
164f_9PA	TGGTGAATCAGTTGAAATCGGT	870	74A
165r_9PA	ACCAAGACGCGCAATCTCTCTT		
165f_9PA	TGGTTCCCACTGCGGTTTTT	961	74B
166r_9PA	GGGAAAAAGCCGCTGAGGAA		
166f_9PA	GCCGCACATCCTTCTCCATT	1042	75A
167r_9PA	ATATTCCCTGCGAGCGATCTGA		
167f_9PA	TGATTGTCTCTCTGGGTTGCT	446	75B
168r_9PA	ACGCGATTACGTCCTGATTTT		
168f2_9PA	ACGACGACATTCAGGATCGAGT	961	76
169r_9PA	ATGCCCGGTTGGTGGGAATTG		
169f2_9PA	TCCCGCAAGCATTTTCAGAGC	866	77
170r2_9PA	TGTCCCTAAAAGCATTGCTCTT		
170f_9PA	GGCATACGTGTTGTGTTTGACA	2151	78A
171r_9PA	TTGTGTCGACCAGTGAGTCA		
171f_9PA	TGCATTGAACCAGAAAGATCCA	3156	78B
173r_9PA	CGCAACGAAGGAATCAAAGACG		
171f_9PA	TGCATTGAACCAGAAAGATCCA	3421	78B2
173r2_9PA	CGATTGCTGTGCTGTTTGAA		
173f_9PA	TGCCAACATATCACCTAGCAAA	4709	79
175r_9PA	TCCGCCAAATCTAAACGTGGA		
175f2_9PA	CGCAAGGCACGATTGATCTT	2294	80A
176r_9PA	TGCTGAGCTCAAAGAGGGAT		
176f_9PA	ACAAGGTTTGTGCGATTGCA	2837	80B
177r_9PA	GATCGGGGCGTTGGAAAGTA		

177f_9PA	GTAAGCGGGGACATTTCAGCA	2902	81
179r_9PA	CGTGCGGCATTGATCACTTC		
179f_9PA	ACATTTGCCTGTACTTGACGTG	1912	82A
325r_m9PA	TGGCACGACAATTGCGTGTA		
325f_m9PA	TGATCCGATGCGAGGTCACA	3637	82B
180r_9PA	GCAAGAATGGCACCAGGGAT		
181r2_9PA	AGGAATGGGTAAATGGTAGGGA	2427	83A2
180f3_9PA	ATCTCATGGCTTCCTCGACA		
181f_9PA	ACCAGTCCATCCTCTCCGAAAT	721	83B
182r_9PA	TCTTTTCACCGATTCTGCGGA		
182f_9PA	GCGGGCAAAGTGAAGACGAT	3526	84
183r_9PA	TCCTCTTGAAGATTGGAAGCGT		
185f_9PA	TCTTCGTCTGTTGTTTCCCCA	1935	88
186r3_9PA	ATTGGGTGTTGTTCTCGGCT		
1f_9PA	TCCCTTTCAACCTAGATCCTGA	1706	89
2r_9PA	AGACAATGTGCAAGTGATCCA		
2f_9PA	TTGCTGGACGTTCTGGAAGT	2085	90
3r_9PA	TGCGTTGTTTCTTACGTCA		
3f_9PA	GCGGGATCAGTAATTTCAACC	2083	91
4r_9PA	ACTCCAGGGCGCATGATTAT		
4f_9PA	TGAGAAAGCTGCGAGGAACA	2545	92
5r_9PA	AGGGAATTAGTGTTGCGCAA		
5f_9PA	CCCTGCTAGAGATTCATTGACA	1667	93
6r_9PA	TCGTGACTTTACATGTTGGTG		
6f_9PA	ATGCCCCTAACTCCGACAGA	1454	94
7r_9PA	AACGGGTGCGGGATCTATTG		
7f_9PA	CGCAGCAAAAATGGTAGGAAC	1984	95
8r_9PA	GAGGGTAGCTTCATGGAGCA		
8f_9PA	TCGCGCACAGGATGGATAAA	819	96
9r_9PA	ACACCATGTAGTCCACCTGA		
9f_9PA	GAACCAATTTTGCCAAGGATCA	2452	97A
10r_9PA	TCCCGTTGCGCTAGAAAAGA		
10f_PA	TCGTGCCGATATCTCCAACG	2230	98
11r_9PA	ACGCGCGGTACTGCTATTAT		
11f_9PA	GGAACAGGACCAAAAACACGA	3106	99
12r_9PA	TGCTGGTTCTTATGCACGAC		
12f2_9PA	CCATCATTTAACTCATCACGCC	1934	100A
13r_9PA	ACGGTGTGTATTACTGGAGCA		
13f_9PA	GCCAACACCACGTAACACTC	2172	101
14r_9PA	AAAGCAGAAGAGTACGGGGA		
14f_9PA	TAAGCCAAATCGTATATATCAC	1114	102
42r_9PA	TTATGCGGCTGTTTCAGCGAA		

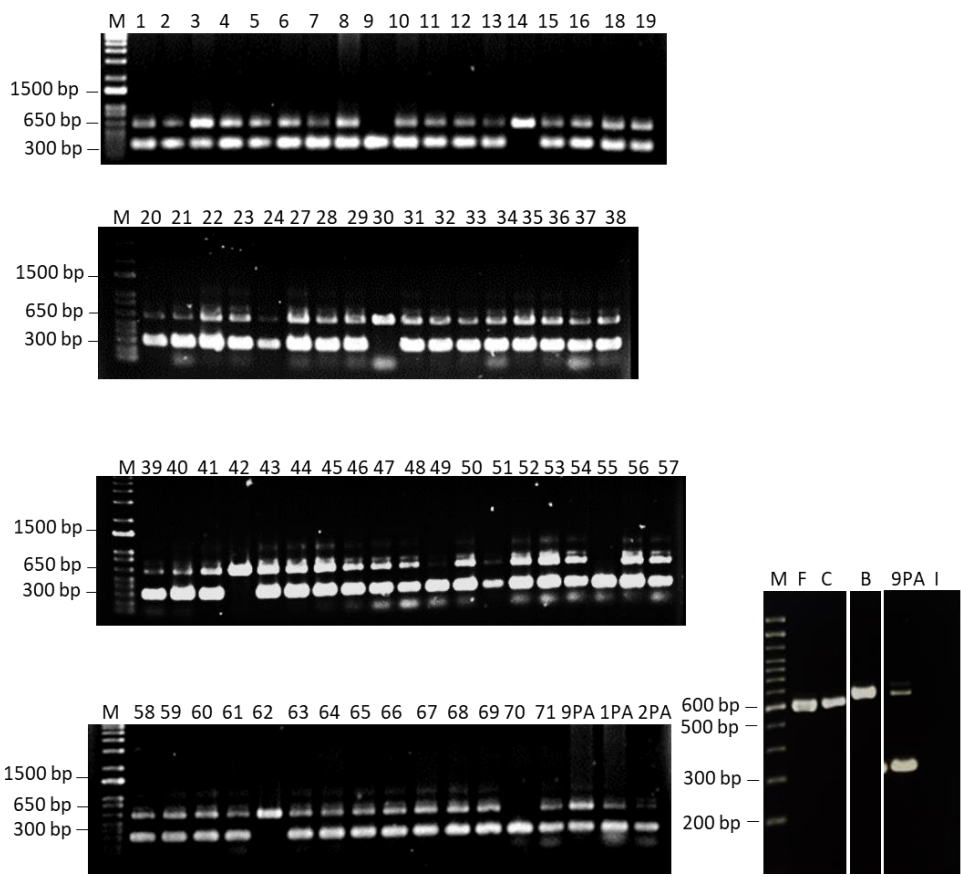
Fonte: a autora

APÊNDICE D – Fragmentos gerados a partir da análise de variabilidade molecular de seis HGRs em 68 amostras de isolados de campo e amostras controles.

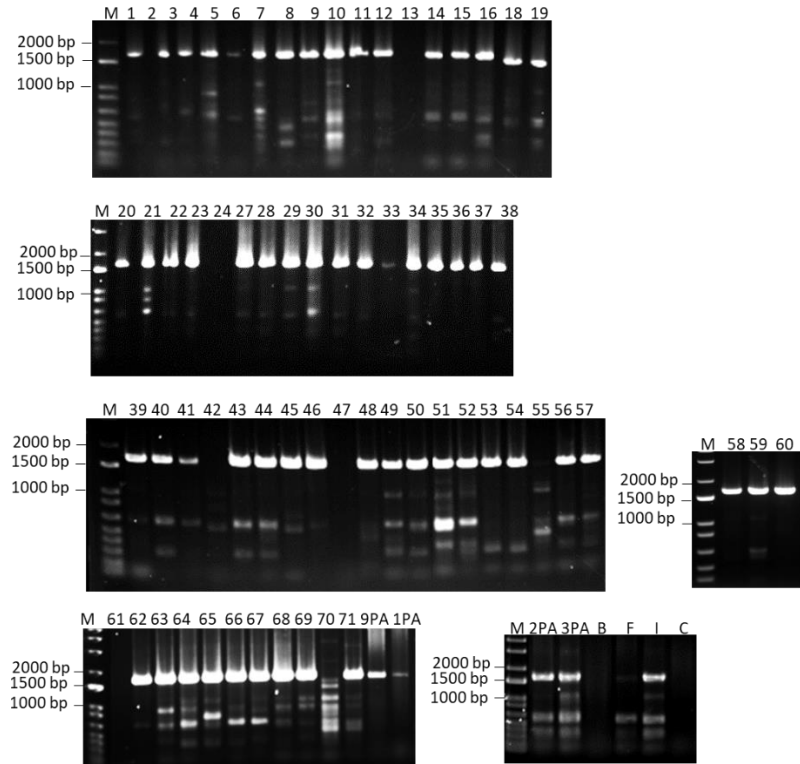
(A) HGR_2



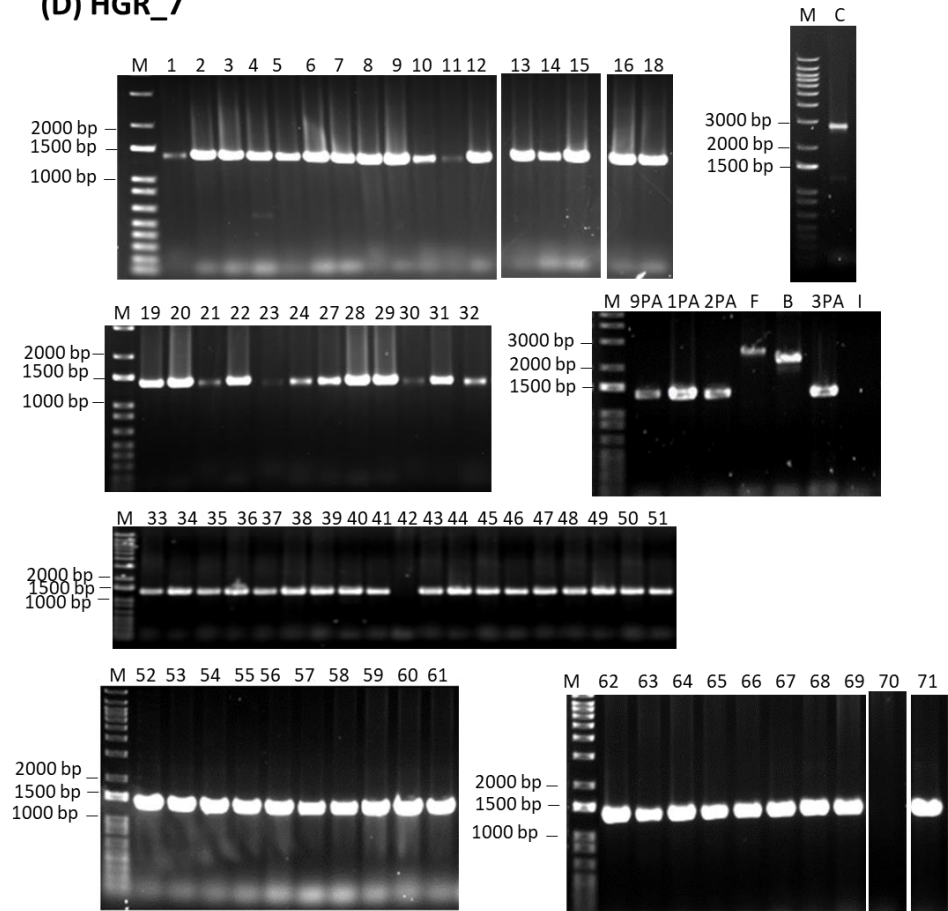
(B) HGR_4

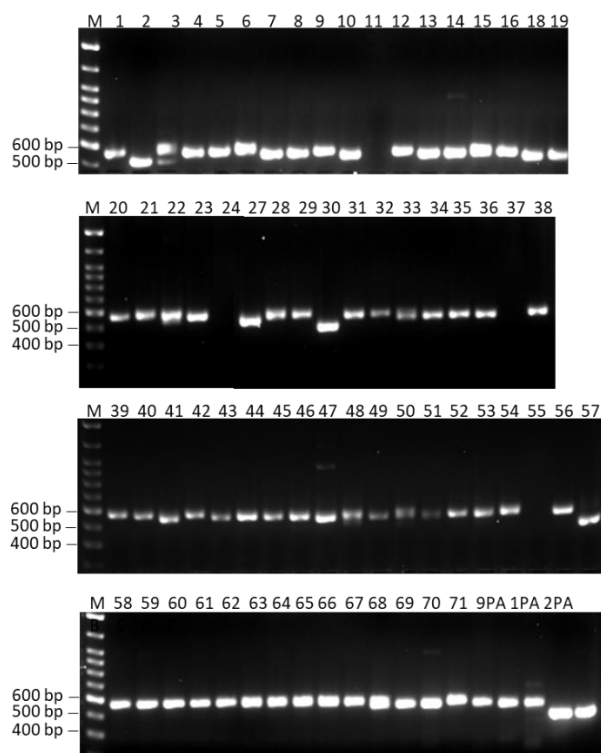
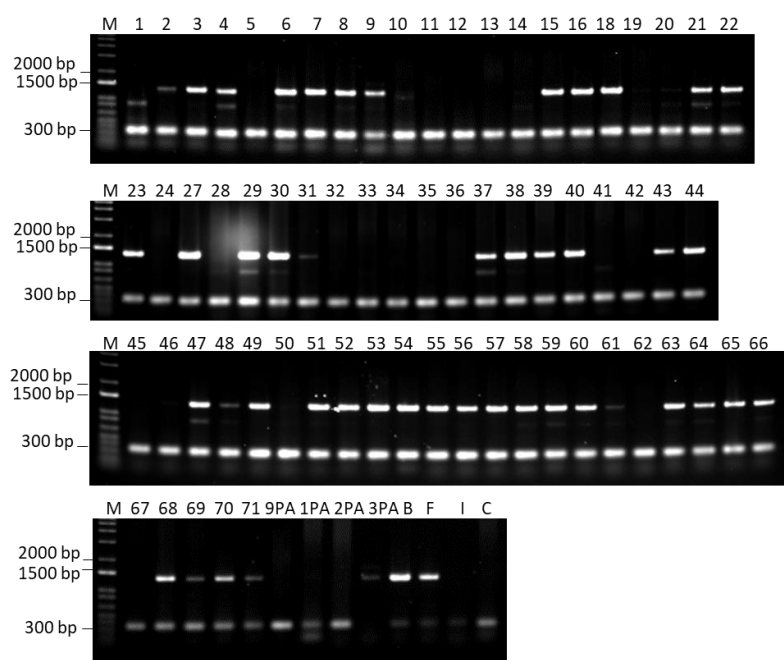


(C) HGR_6



(D) HGR_7



(E) HGR_12**(F) HGR_M**

Amplificações para seis HGRs usando os primers 2F/2R (A), 4F/4R (B), 6F/6R (C), 7F/7R (D), 12F/12R (E) e LJ1194f/ LJ1195r e LJ240f/LJ234r (F). Nas imagens (A) a (F), as canaletas 1 a 16, 18 a 24 e 27 a 71 são amostras de DNA de isolados de campo; as canaletas 9PA, 1PA, 2PA e 3PA são amostras de DNA dos isolados CLas da Fundecitrus; as canaletas B – Behai, F – Flórida, I – Índia e C- Costa Rica são amostras de DNA de isolados-controle. Em (A), (B), (C), (D) e (F), a canaleta M é o marcador de 1 kb plus da Invitrogen e em (E) e em uma imagem de (B), M é o marcador de 100 pb da Invitrogen.

Fonte: a autora