

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 16/07/2024.

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 Recombinantemente - 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 Agrônoma - 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 ninfa 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

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.

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
- JAGOEUX, 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.