

JOSIANE CECÍLIA DAROLT

**TRANSCRIÇÃO DE GENES DE ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ EM
Diaphorina citri E PREVALÊNCIA BACTERIANA EM *D. Citri* E EM
LARANJEIRA DOCE COM ‘*Ca. L. asiaticus*’ E ‘*Ca. L. americanus*’**

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

Araraquara

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

D224t Darolt, Josiane Cecília
Transcrição de genes de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'
em *Diaphorina citri* e prevalência bacteriana em *D. citri* e em
laranjeira doce com '*Ca. L. asiaticus*' e '*Ca. L. americanus*' /
Josiane Cecília Darolt. – Araraquara - SP : [s.n.], 2021
144 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto
de Química
Orientador: Nelson Arno Wulff

1. Transcriptoma. 2. Expressão gênica. 3. Laranja - Doenças e
pragas. 4. Infecções bacterianas gram-negativas. 5. Inseto como
transmissor de doenças. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: " TRANSCRIÇÃO DE GENES DE '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' EM *Diaphorina citri* E PREVALÊNCIA BACTERIANA EM *D. citri* E EM LARANJEIRA DOCE com '*Ca. L. americanus*' e '*Ca. L. asiaticus*' "

AUTORA: JOSIANE CECÍLIA DAROLT

ORIENTADOR: NELSON ARNO WULFF

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

DocuSigned by:

Prof. Dr. NELSON ARNO WULFF (Participação Virtual)

Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento / Fundo de Defesa da Citricultura - FUNDECITRUS - Araraquara

Prof. Dra. MARIA CÉLIA BERTOLINI (Participação Virtual)

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

Prof. Dra. TAÍCIA PACHÊCO FILL (Participação Virtual)

Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNICAMP - Campinas

Prof. Dr. FERNANDO LUIS CONSOLI (Participação Virtual)

Departamento de Entomologia e Acarologia / Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - USP - Piracicaba

Prof. Dr. JESUS APARECIDO FERRO (Participação Virtual)

Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Jaboticabal

Araraquara, 12 de março de 2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



DADOS CURRICULARES

Nome: Josiane Cecília Darolt

Nome em citações bibliográficas: DAROLT, J. C.; DAROLT, JC; Josiane C. Darolt; JC Darolt

Endereço Profissional

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara. Rua Prof. Francisco Degni, 55 – Quitandinha – Araraquara/SP, CEP 14800-060

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

Formação Acadêmica / Titulação

MESTRADO EM CIÊNCIAS

Universidade Federal de Santa Catarina

Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (2016)

GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Universidade Federal de Santa Catarina (2014)

Publicações

DAROLT, JOSIANE CECÍLIA; FASSINI, CAMILA GIÁCOMO; WULFF, NELSON ARNO; DI PIERO, ROBSON MARCELO. Gene expression of salicylic acid and jasmonic acid pathways and photosynthesis parameters of sweet orange trees in response to acibenzolar-S-methyl. *Tropical Plant Pathology*, v. Jun/20, p. 01-13, 2020.

DAROLT, JOSIANE CECÍLIA; ROCHA NETO, ARGUS CEZAR DA; DI PIERO, ROBSON MARCELO. Effects of the protective, curative, and eradivative applications of chitosan against *Penicillium expansum* in apples. *Brazilian Journal of Microbiology* (Impresso), v. 126, p. 1-6, 2016.

Trabalhos recentes apresentados em congressos internacionais

F. M. M. BENTO; J. C. Darolt; B. MERLIN; WULFF, N. A.; F. L. CONSOLI. *Candidatus Liberibacter asiaticus* gene expression in gut of nymphs and adults of *Diaphorina citri*. In: Molecular Insect Science, 2019, Barcelona. Anais do Eighth International Symposium on Molecular Insect Science, 2019.

Trabalhos recentes apresentados em congressos nacionais

DAROLT J.C.; BENTO F.M.M.; MERLIN B.; WULFF N.A.; F.L. CÔNSOLI. Differential gene expression from *Candidatus Liberibacter asiaticus* during earlier *Diaphorina citri* bacterium gut colonization. In: 51º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Recife-PE. 2019.

DAROLT, J. C.; FASSINI, C. G.; WULFF, N. A.; PIERO, R. M. Gene expression in sweet orange (*Citrus sinensis*) treated with Acibenzolar-S-Methyl and inoculated with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. In: 50º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2017, Uberlândia-MG. Anais do 50º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2017.

Participação em eventos científicos:

V Simpósio Mastercitrus. 2017. Araraquara-SP (Simpósio).

50º Congresso Brasileiro de Fitopatologia- Uberlândia-MG. 2017.

2nd São Paulo XanthoMeeting. São Paulo- SP. 2018. (Simpósio).

7º ENCITROS- Encontro Técnico e Científico de Citros. Araraquara-SP. 2019.

51º Congresso Brasileiro de Fitopatologia- Recife-PE- 2019.

Formação complementar:

Ferramentas Avançadas de Diagnose. (Carga horária: 4h).

Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Brasil.

Introdução às técnicas de RNAi, CRISPR e análise de microRNAs. (Carga horária: 48h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Aspectos bioquímicos e moleculares da indução de resistência em plantas a patógenos. Promovido pela CBAB (80 horas). Atuação como docente no curso. UFSC, Florianópolis-SC, Brasil. (Curso). 2017/2018.

DEDICATÓRIA

*Aos meus amados pais Florindo e Rosenilde, e aos
meus irmãos*

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e ao Fundecitrus pela concessão das bolsas durante o andamento do Doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro (2015/07011-3).

À Universidade Estadual Paulista e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Aos meu orientador, o professor Nelson Arno Wulff, pela disponibilidade, pela paciência e valiosos ensinamentos.

Ao Fundecitrus pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho. Também a equipe do laboratório do Departamento de Diagnóstico de Doenças e Biotecnologia, Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos e Equipe de doenças bacterianas, sem o apoio técnico e amizade de vocês não seria possível à realização desse trabalho.

À banca examinadora.

Ao meu parceiro e companheiro de vida Haroldo X. L. Volpe.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

**TRANSCRIÇÃO DE GENES DE ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ EM
Diaphorina citri E PREVALÊNCIA BACTERIANA EM *D. citri* E EM
LARANJEIRA DOCE COM
‘*Ca. L. asiaticus*’ E ‘*Ca. L. americanus*’**

RESUMO

A produção de laranja doce do Brasil se destaca no cenário mundial. Dentre as diversas doenças que acometem a cultura, a de maior importância é o Huanglongbing (HLB), que tem como agentes causais bactérias gram-negativas restritas aos vasos do floema do gênero *Candidatus Liberibacter* spp.; O psíldeo asiático dos citros *Diaphorina citri*, vetor de *Ca. Liberibacter asiaticus* (Las) e *Ca. L. americanus* (Lam), está disseminado no Brasil e exige esforços intensivos e conjuntos para o seu controle. A não existência de variedades comerciais de citros resistentes ao HLB, nem medidas curativas para o manejo desta doença impactam negativamente a produção, resultando em perdas econômicas, bem como o aumento dos custos de produção. O manejo do inseto vetor e da fonte de inóculo é viável, mas dependente de ações internas e externas à propriedade. Uma abordagem factível para o controle da doença é o uso de biotecnologia para gerar plantas geneticamente modificadas com resistência a *D. citri* e/ou à bactéria. Para isso, faz-se necessário gerar informações sobre genes alvos a serem empregados em estratégias biotecnológicas contra ambos os organismos, bactéria ou inseto vetor. No presente trabalho foi reportado 95% dos genes expressos por Las durante o processo inicial da colonização da bactéria em *D. citri* além da presença de genes do profago PJXGC-3 na estirpe brasileira de Las. Além disso foi analisada a aquisição de Las e Lam pelo inseto em condição de infecção simples, sequencial, bem como durante a fase assintomática da doença em laranja doce. Finalmente foi demonstrado que Las se sobressai à Lam durante a aquisição pelo psíldeo e que ocorre a prevalência de Las em relação a Lam em laranja doce com dupla infecção bacteriana.

Palavras-chaves: Huanglongbing; Liberibactérias; psíldeo asiático dos citros, profagos.

**TRANSCRIPTION OF GENES OF 'Candidatus Liberibacter asiaticus' IN
Diaphorina citri AND BACTERIAL PREVALENCE IN *D. citri* AND IN SWEET
ORANGE PLANTS WITH
'Ca. L. asiaticus 'AND 'Ca. L. americanus'**

ABSTRACT

Brazil's sweet orange production stands out on the world scenario. Among the various diseases that affect the citriculture, the most important is Huanglongbing (HLB), whose causative agents are gram-negative bacteria of the genus *Candidatus Liberibacter* spp and restricted to phloem vessels; The Asian Citrus Psyllid (ACP) *Diaphorina citri*, vector of *Ca. Liberibacter asiaticus* (Las) e *Ca. L. americanus* (Lam), is widespread in Brazil and requires intensive and joint efforts for its control. The absence of commercial varieties of citrus resistant to HLB, nor curative measures for the management of this disease, negatively impact the citrus production, resulting in economic losses, as well as in increases on production costs. The management of the insect vector and the inoculum source is possible, but dependent on internal and external actions to the management of citrus groves. A feasible approach to the disease control is the use of biotechnology to generate genetically modified plants resistant to ACP and/or bacteria. For that, it is necessary to generate information related to target genes to be used in biotechnological strategies against both organisms, bacteria or ACP. In this study, we report 95% of the genes expressed by Las during the initial process of bacterial colonization in ACP, as well as the presence of prophage PJXGC-3 key genes in the Brazilian Las strain. Moreover, we analyzed ACP acquisition of Las and Lam under simple and sequential infection, as well as during the asymptomatic phase of the disease in sweet orange plants. Finally, we demonstrated that Las stands out Lam during ACP bacterial acquisition and that the prevalence of Las in relation to Lam occurs in sweet orange plants with double bacterial infection.

Key words: Huanglongbing; Liberibacteria; Asian Citrus Psyllid, prophages.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1.** Levantamento do progresso temporal da incidência de plantas com sintomas de HLB no estado de São Paulo.....22
- Figura 2.** Fases do desenvolvimento de *D. citri*: ovo, ninfa (1º a 5º instares) e adulto.....23
- Figura 3.** Proporção de amostras de citros positivas para *Ca. L. asiaticus* (Las), *Ca. L. americanus* (Lam), Fitoplasma do grupo 16SrIX e do grupo 16SrIII no serviço de diagnóstico de HLB (103 mil amostras, 2004 a 2020)28

Capítulo 2 - O GENOMA DE *Candidatus Liberibacter asiaticus* É ALTAMENTE TRANSCRITO QUANDO INFECTA O INTESTINO DE *Diaphorina citri*

- Figura 1.** Diagrama de Venn dos genes de *Candidatus Liberibacter asiaticus* com leituras mapeadas (isolado JXGC, NZ_CP019958.1) em amostras de intestinos de *Diaphorina citri* após 1/2 (Las I), 3/4 (Las II), ou 5/6 (Las III) dias de acesso à aquisição.....56
- Figura 2.** Abundância de leituras mapeadas para genes de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (isolado JXGC, NZ_CP019958.1) expressos em amostras de intestinos de *Diaphorina citri* após 1/2 (Las I) (A), 3/4 (Las II) (B), ou 5/6 (Las III) (C) dias de acesso à aquisição.....58
- Figura 3.** Distribuição dos agrupamentos de grupos ortólogos em *Candidatus Liberibacter asiaticus* (isolado JXGC, NZ_CP019958.1) em amostras de intestinos de *Diaphorina citri* após 1/2 (Las I) (A), 3/4 (Las II) (B), ou 5/6 (Las III) (C) dias de acesso a aquisição.....59
- Figura 4.** Nível de expressão de genes ao longo do cromossomo de *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Agrupamentos flagelares (COG N: I, II e III), “Família Flp do tipo IVb de pilina” (COG U), transferases (COG M), proteínas ribossomais e NADH-quinonas são individualmente mostrados em sua posição no cromossomo. Abundância de leitura (log2FPKM) obtidas de bibliotecas de intestinos de *Diaphorina citri* 5/6 dias após acesso à aquisição e mapeadas na linhagem JXGC (NZ_CP019958.1)61
- Figura 5.** Leituras mapeadas nos profagos SC1 (tipo 1), SC2 (tipo 2) do isolado Las UF506 (HQ377374) e PJXGC-3 (tipo 3) do isolado Las JXGC (KY661963). Setas azuis indicam genes mapeados em pelo menos duas bibliotecas. Setas vermelhas indicam genes sem leituras mapeadas. Asteriscos indicam o gene com maior número de leituras mapeadas. O quadro de linhas pontilhadas (preto) indica a região altamente conservada de genes tardios entre os profagos de Las. O nível de expressão foi obtido de bibliotecas de intestinos de *Diaphorina citri* após 5/6 dias (Las III) de alimentação em laranjeiras doce infectadas com Las.....63

Capítulo 3 - *Candidatus Liberibacter asiaticus* E *Candidatus Liberibacter americanus* EM COINFEÇÃO EM CITROS E AQUISIÇÃO POR *Diaphorina citri*

Figura 1. Esquema da instalação e condução dos experimentos de aquisição de *Candidatus Liberibacter americanus* por *Diaphorina citri* em plantas de laranja doce com folhas maduras, sintomáticas e qPCR positivas para Lam. DAA: dias de acesso à aquisição.94

Figura 2. Esquema representativo dos experimentos de aquisição de Ca. L. *americanus* (Lam) por *Diaphorina citri* criados em plantas fontes para Ca. L. *asiaticus* e transferidas para plantas com Lam com fluxos vegetativos naturais contendo predominantemente folhas maduras sintomáticas.96

Figura 3. Esquema representativo dos ensaios de aquisição de *Candidatus* L. *americanus* (Lam) por *Diaphorina citri* criados em plantas positivas para Ca. L. *asiaticus* e transferidas para plantas positivas para Lam com brotações jovens induzidos por poda manual. Avaliação das gerações de F1 e F2 de *Diaphorina citri*.98

Figura 4. Esquema da instalação e condução dos experimentos de aquisição de *Diaphorina citri* nas gerações F1 e F2, a partir de psílídeos criados em plantas positivas para Ca. L. *americanus* e transferidos para plantas saudas.....99

Figura 5. Esquema da instalação e condução dos experimentos de aquisição de psílídeos nas gerações F1 e F2, a partir da criação dos insetos em plantas positivas para Ca. L. *asiaticus* e transferidos para plantas saudas.....100

Figura 6. Esquema da instalação e condução dos experimentos de aquisição de psílídeos nas gerações F1 e F2, a partir da criação dos insetos em plantas positivas para Ca. L. *asiaticus* e Ca. L. *americanus*.102

Figura 7. Porcentagem média (A) e Ct médio (B) de *Candidatus Liberibacter americanus* em adultos de *Diaphorina citri* com 12 dias de acesso à aquisição (DAA) em planta fonte de Ca. L. *americanus* com folhas maduras e sintomáticas. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Kruskal Wallis/Dunn a 5% de probabilidade.107

Figura 8. Porcentagem (A e C) e Ct médio (B e D) no experimento 2.1 (A e B) e no experimento 2.2 (C e D), de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) e *Candidatus Liberibacter americanus* (Lam) em adultos de *Diaphorina citri* gerados em plantas fonte de Las (geração F1) e posteriormente confinados e mantidos por 12 dias em planta fonte de Lam contendo folhas maduras e sintomáticas. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Kruskal Wallis/Dunn a 5% de probabilidade.....109

Figura 9. Porcentagem (A e C) e Ct médio (B e D) de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) e *Candidatus Liberibacter americanus* (Lam) em adultos de *Diaphorina citri* criados (geração F1) em plantas fonte de Ca. L. *asiaticus* e posteriormente confinados e mantidos por 12 dias em planta fonte de Ca. L. *americanus* contendo folhas maduras e sintomáticas (A e B). Psílídeos adultos da geração F2 (C e D) que tiveram acesso à aquisição assintomática (experimento 3.1). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Kruskal Wallis/Dunn a 5% de probabilidade.....111

Figura 10. Porcentagem (A e C) e Ct médio (B e D) de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) e *Candidatus Liberibacter americanus* (Lam) em adultos de *Diaphorina citri* criados (geração F1) em plantas fonte de Ca. L. asiaticus e posteriormente confinados e mantidos por 12 dias em planta fonte de Ca. L. americanus contendo folhas maduras e sintomáticas (A e B). Psílídeos adultos da geração F2 (C e D) que tiveram acesso à aquisição assintomática (experimento 3.2). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Kruskal Wallis/Dunn a 5% de probabilidade.....113

Figura 11. Porcentagem (A) e Ct médio (B) de *Candidatus Liberibacter americanus* (Lam) em adultos de *Diaphorina citri* criados (geração F1) em plantas fonte de Ca. L. americanus e posteriormente confinados e mantidos por 12 dias em brotos de plantas sadias. Psílídeos adultos da geração F2 que tiveram acesso à aquisição assintomática (experimento 4). Médias seguidas de mesma letra, em cada experimento, não diferem entre si pelo teste Wilcoxon-Mann-Whitney a 5% de probabilidade.....115

Figura 12. Porcentagem (A) e Ct médio (B) de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (Las) em adultos de *Diaphorina citri* criados (geração F1) em planta fonte de Ca. Liberibacter asiaticus e posteriormente confinados e mantidos por 12 dias em brotos de plantas sadias. Psílídeos adultos da geração F2 que tiveram acesso à aquisição assintomática (experimento 5). Médias seguidas de mesma letra, em cada experimento, não diferem entre si pelos testes Kruskal Wallis/Dunn (B) e Wilcoxon-Mann-Whitney (D) a 5% de probabilidade.....116

Figura 13. Porcentagem (A e C) e Ct médio (B e D) de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) e *Candidatus Liberibacter americanus* (Lam) em adultos de *Diaphorina citri* criados (geração F1) em plantas fonte em ramos com coinfeção de Ca. L. asiaticus e Ca. L. americanus e posteriormente confinados e mantidos por 12 dias em plantas sadias contendo brotos (A e B). Psílídeos adultos da geração F2 (C e D) que tiveram acesso à aquisição assintomática (experimento 6). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Kruskal Wallis/Dunn a 5% de probabilidade.....118

Figura 14. Curva da evolução temporal da aquisição de *Candidatus Liberibacter americanus* por *Diaphorina citri* na geração F1. NS= Valores médios de Ct não significativos por Kruskal Wallis/Dunn a 5% de probabilidade.....119

Figura 15. Porcentagem de prevalência das Liberibactérias em plantas de laranja doce ao longo de 3 anos no experimento I (A) e 2,5 anos no experimento II (B). nd = Não detectado; Lam *Candidatus Liberibacter americanus* e Las: *Candidatus Liberibacter asiaticus*.122

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2 - O GENOMA DE *Candidatus Liberibacter asiaticus* É ALTAMENTE TRANSCRITO QUANDO INFECTA O INTESTINO DE *Diaphorina citri*

Tabela 1. Concentração de RNA (ng/μL) e qualidade (260/280) mensuradas espectrofotometricamente e detecção de *Diaphorina citri* (DC) e *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) (HLBaspr) por qPCR em amostras de RNA preparadas a partir de intestinos de *D. citri*, antes do tratamento com DNase e sequenciamento das bibliotecas. Amostras de intestinos dissecados de *D. citri* criados em plantas de citros sadias (H) ou Las em diferentes períodos acessos de aquisição (PAA) (Las I, II e III).52

Tabela 2. Mapeamento de leituras de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) contra o isolados JXGC (NZ_CP019958.1) em bibliotecas sequenciadas a partir de amostras intestinos de *Diaphorina citri* que se alimentaram em brotos de citros sadios (H) ou Las positivos, em diferentes períodos de acesso a aquisição (PAA) (Las I, II e III).54

Capítulo 3 - *Candidatus Liberibacter asiaticus* E *Candidatus Liberibacter americanus* EM COINFECÇÃO EM CITROS E AQUISIÇÃO POR *Diaphorina citri*

Tabela 1. Porcentagem e Ct médio de *Candidatus Liberibacter americanus* em fluxos vegetativos de laranjeira-doce entre os estádios de desenvolvimento V1 a V6.120

Tabela 2. Médias de Ct das Liberibactérias em amostragens semestrais nos ramos ao longo de 36 meses no experimento I e 30 meses no experimento II, em laranjeiras doce sadia, fonte de *Candidatus Liberibacter americanus*, plantas sadias inoculadas por psílídeos infectivos com *Ca. L. asiaticus* e plantas fonte de *Ca. L. americanus* que foram inoculadas por psílídeos infectivos com *Ca. L. asiaticus* e coinfectadas, gerando ramos com infecção simples e ramos com dupla infecção (*Ca. L. americanus* e *Ca. L. asiaticus*).125

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ct - do inglês '*Cicle threshold*', ou ciclo limiar

PCR - Reação em cadeia da polimerase

qPCR – PCR quantitativo em tempo real

RNA - Ácido ribonucleico

DNA - Ácido desoxirribonucleico

cDNA - fita de DNA complementar

ORF - fase de leitura aberta (do inglês '*open reading frame*')

DNase - Enzima que degrada o DNA

PAA - Período de acesso à aquisição

ACP- psílídeo asiático dos citros; do inglês: '*Asian citrus psyllid*'

DAA - Dias após a aquisição

PAI - período de acesso à inoculação

PAA - período de acesso à aquisição

HLB - Huanglongbing

Ca. L. asiaticus ou Las – *Candidatus Liberibacter asiaticus*

Ca. L. americanus ou Lam – *Candidatus Liberibacter americanus*

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	19
1.1 A citricultura brasileira	19
1.2 Huanglongbing (HLB)	19
1.3 O inseto vetor <i>Diaphorina citri</i>	22
1.4 Interação entre as Liberibactérias do HLB e seus hospedeiros	27
1.5 Profagos e Liberibactérias.....	29
1.6 Atualidade e perspectivas para o manejo do HLB e de <i>Diaphorina citri</i>	31
REFERÊNCIAS.....	34
CAPÍTULO 2	43
O GENOMA DE <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> É ALTAMENTE TRANSCRITO QUANDO INFECTA O INTESTINO DE <i>Diaphorina citri</i>	43
RESUMO.....	43
ABSTRACT	44
1 INTRODUÇÃO.....	45
2 MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1 Obtenção das amostras	47
2.2 Extração do RNA total das amostras de intestino do psíldeo, detecção da presença de Las e tratamento com DNase	48
2.3 Enriquecimento do mRNA das amostras e avaliação da qualidade	49
2.4 Sequenciamento do cDNA via plataforma Illumina	49
2.5 Análise do sequenciamento e mapeamento das leituras no genoma de referência.....	50
3 RESULTADOS	51
3.1 Presença de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> em amostras de intestino do psíldeo <i>Diaphorina citri</i>	51
3.2 Mapeamento das leituras de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	53
3.3 Mapeamento dos profagos SC1, SC2 e PJXGC-3 de Las no intestino de ACP.....	62
4 DISCUSSÃO	64
5 CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS.....	75
CAPÍTULO 3	84
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> E <i>Candidatus Liberibacter americanus</i> EM COINFECÇÃO DE LARANJEIRA DOCE	84

E NA AQUISIÇÃO POR <i>Diaphorina citri</i>	84
RESUMO.....	84
ABSTRACT	85
1 INTRODUÇÃO	86
2 OBJETIVOS	89
2.1 Objetivo geral	89
2.2 Objetivos específicos:	89
3 MATERIAL E MÉTODOS	89
3.1 Condições dos ensaios de aquisição em plantas sintomáticas e plantas assintomáticas	90
3.1.1 Criação de <i>Diaphorina citri</i>	90
3.1.2 Plantas fonte com <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> ou <i>Ca. L. americanus</i>	91
3.1.3 Plantas de laranja doce para a aquisição assintomática de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> ou de <i>Ca. L. americanus</i> com a progênie infectiva de <i>Diaphorina citri</i>	91
3.1.4 Detecção de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> e <i>Ca. L. americanus</i> em <i>Diaphorina citri</i>	92
3.1.5 Condições ambientais dos ensaios de aquisição de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> e <i>Ca. L. americanus</i> por <i>Diaphorina citri</i> e nomenclatura para classificação da geração dos psíldeos	93
3.2 Ensaios de aquisição de <i>Candidatus Liberibacter americanus</i> e <i>Ca. L. asiaticus</i> por <i>Diaphorina citri</i>	93
3.2.1 Experimento 1: Aquisição de <i>Candidatus Liberibacter americanus</i> por adultos sadios de <i>Diaphorina citri</i>	94
3.2.2 Experimento 2: Aquisição sequencial de <i>Candidatus Liberibacter americanus</i> por uma progênie de <i>Diaphorina citri</i> gerada em planta fonte de <i>Ca. L. asiaticus</i>	95
3.2.3 Experimento 3: Aquisição sequencial de <i>Candidatus Liberibacter americanus</i> por uma progênie de <i>Diaphorina citri</i> gerada em planta fonte de <i>Ca. L. asiaticus</i> e aquisição assintomática de <i>Ca. L. asiaticus</i> e/ou <i>Ca. L. americanus</i> pela progênie F2 de <i>D. citri</i>	96
3.2.4 Experimento 4: Aquisição de <i>Candidatus Liberibacter americanus</i> por uma progênie de <i>Diaphorina citri</i> gerada em planta fonte de <i>Ca. L. americanus</i> e aquisição assintomática de <i>Ca. L. americanus</i> pela progênie F2 de <i>D. citri</i>	98
3.2.5 Experimento 5: Aquisição de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> por uma progênie de <i>Diaphorina citri</i> gerada em planta fonte de <i>Ca. L. asiaticus</i> e aquisição assintomática de <i>Ca. L. asiaticus</i> pela progênie F2 de <i>D. citri</i>	100

3.2.6 Experimento 6: Aquisição de <i>Liberibacter</i> por uma progênie de <i>Diaphorina citri</i> gerada em planta fonte com <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> e <i>Ca. L. americanus</i> e aquisição assintomática de <i>Liberibacter</i> pela progênie F2 de <i>D. citri</i>	101
3.2.7 Experimento 7: Curva de aquisição de ' <i>Candidatus Liberibacter americanus</i> ' pela progênie de <i>Diaphorina citri</i> desenvolvida em planta fonte ao longo do tempo	103
3.2.8 Análise dos dados.....	104
3.3 Amostragem de fluxos vegetativos de laranja doce positivas para <i>Candidatus Liberibacter americanus</i>	104
3.4 Prevalência de <i>Candidatus Liberibacter americanus</i> e <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> em plantas fonte de <i>Ca. L. americanus</i> , após inoculação de <i>Ca. L. asiaticus</i> por progênie de <i>Diaphorina citri</i> gerada em planta fonte de <i>Ca. L. asiaticus</i>	105
4 RESULTADOS	107
4.1 Ensaios de aquisição de <i>Candidatus Liberibacter americanus</i> e <i>Ca. L. asiaticus</i> por <i>Diaphorina citri</i>	107
4.1.1 Experimento 1: Aquisição de <i>Candidatus Liberibacter americanus</i> por adultos sadios de <i>Diaphorina citri</i> em laranja-doce	107
4.1.2 Experimento 2: Aquisição cruzada de <i>Candidatus Liberibacter americanus</i> por <i>Diaphorina citri</i> : criação em laranjeiras-doce positivas para <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> e transferidos para fluxos vegetativos naturais de laranjeiras-doce positivas para <i>Ca. L. americanus</i> : análise da geração F1.....	108
4.1.3 Experimento 3: Aquisição cruzada de <i>Candidatus Liberibacter americanus</i> por <i>Diaphorina citri</i> : criação em laranjeiras-doce positivas para <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> e transferência para brotações induzidas por poda em laranjeiras doce positivas para <i>Ca. L. americanus</i> : análise das gerações F1 e F2.....	110
4.1.4 Experimento 4: Aquisição por <i>Diaphorina citri</i> sadio em brotações induzidas (poda manual) de laranjeiras-doce positivas para <i>Candidatus Liberibacter americanus</i> : análise das gerações F1 e F2.....	114
4.1.5 Experimento 5: Aquisição por <i>Diaphorina citri</i> sadio em brotações induzidas de laranjeiras-doce positivas para <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> : análise das gerações F1 e F2.....	115
4.1.6 Experimento 6: Aquisição por <i>Diaphorina citri</i> sadio em brotações e fluxos vegetativos naturais de laranjeiras-doce com dupla infecção (<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> e <i>Candidatus Liberibacter americanus</i>): análise das gerações F1 e F2.....	117
4.1.7 Experimento 7: Curva de evolução da aquisição de <i>Candidatus Liberibacter americanus</i> na geração F1 de <i>Diaphorina citri</i>	119

4.2 Amostragem temporal de fluxos vegetativos de laranjeira doce positivas para <i>Candidatus Liberibacter americanus</i>	120
4.3 Prevalência de <i>Candidatus Liberibacter americanus</i> e <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> em laranjeiras doce inicialmente inoculadas com borbulhas Ca. L. <i>americanus</i> e posteriormente inoculadas com Ca. L. <i>asiaticus</i> por meio de fitofagia de adultos de <i>Diaphorina citri</i>	121
5 DISCUSSÃO	126
6 CONCLUSÕES	137
REFERÊNCIAS.....	138
APÊNDICES.....	143

1- INTRODUÇÃO

1.1 A citricultura brasileira

O suco de laranja é uma das mais importantes commodities do Brasil, (NEVES, 2016). O cinturão citrícola, que compreende o estado de São Paulo e o Triângulo Mineiro, concentra a maior região produtora de laranja e exportadora de suco do país. Fatores como o desenvolvimento industrial, a proximidade com os portos e centros de pesquisa contribuíram para o desenvolvimento da atividade nesta região. A cadeia citrícola paulista possui alta capacidade de produção, bem como eficiência nos processos, com 408 mil hectares de pomares (FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA, 2020a), representando 34% da produção de laranja do mundo. Esses dados torna o Brasil o maior exportador de suco de laranja, responsável por 85% das exportações globais deste produto, além disso, atende a um pequeno, porém crescente mercado interno (NEVES & TROMBIN, 2017).

No agronegócio brasileiro, o setor citrícola destaca-se por gerar um produto interno bruto (PIB) de 6,5 bilhões de dólares em todos os elos de sua cadeia produtiva e empregar direta e indiretamente 230 mil pessoas (NEVES et al., 2015). Entretanto, a concentração dos pomares citrícolas acarretou na maior incidência de pragas e doenças, com impacto econômico e social, assim como no desenvolvimento da pesquisa científica e avanços tecnológicos.

1.2 Huanglongbing (HLB)

Dentre as diversas pragas e doenças que acometem a cultura, o Huanglongbing (HLB), conhecido também como greening, é considerado a doença mais devastadora e a maior ameaça à produção de citros. Devido ao alto

potencial de disseminação e por não haver cura para a doença, gera perdas na produção de frutas e aumenta o custo do manejo, agravado por não haver variedades comerciais de citros resistentes a doença (BOVÉ, 2006; LOPES & FRARE, 2008; BASSANEZI et al., 2020; ZHOU, 2020; GRAHAM et al., 2020).

Embora o HLB seja uma doença cítrica de relato recente no estado de São Paulo, em 2004, e na Flórida em 2005 (COLETA-FILHO et al., 2004; HALBERT, 2005), essa doença tem ocasionado prejuízos e colocado em risco a atividade citrícola (BOVÉ, 2006), por perdas de até 100% na produtividade de pomares comerciais (BASSANEZI et al., 2012).

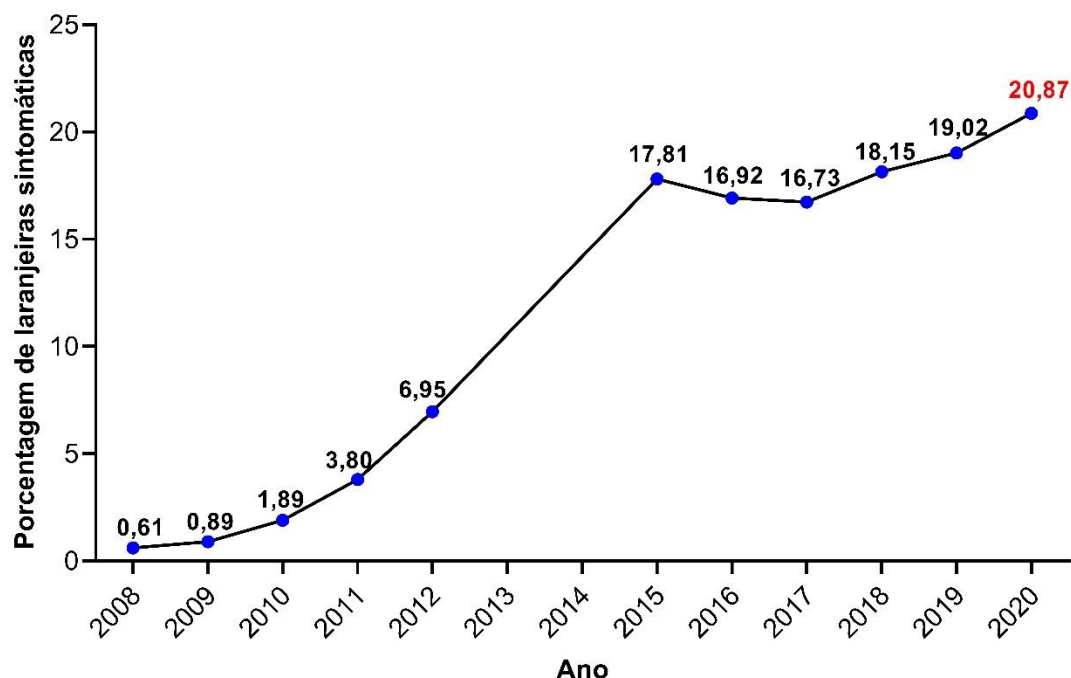
O HLB está associado a bactérias gram-negativas e restritas ao floema, pertencentes ao grupo das alfa-proteobactérias e ao gênero *Candidatus Liberibacter* spp. (LAFLÉCHE & BOVÉ, 1970; JAGOEIX et al., 1994). Foram identificadas três espécies associadas ao HLB: *Candidatus Liberibacter africanus* (Laf) – restrita ao continente africano, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) - cosmopolita e *Candidatus Liberibacter americanus* (Lam) - restrita ao Brasil (TEIXEIRA et al., 2005a; BOVÉ, 2006; TEIXEIRA et al., 2010). No mais, fitoplasmas estão associados aos sintomas de HLB, porém com ocorrência ocasional (TEIXEIRA et al., 2008; CHEN et al., 2009; WULFF et al., 2019).

No campo, as plantas doentes apresentam inicialmente sintomas em um ou mais ramos, sendo mais comum sua observação no outono e início do inverno (BOVÉ, 2006). As folhas presentes nestes ramos perdem a coloração verde e apresentam-se parcialmente amareladas e verdes, sintoma denominado ‘mosqueado’, que é o sintoma mais característico da doença. O mosqueado tem sido observado em todos os locais onde a doença foi descrita (BOVÉ, 2006; BELASQUE JUNIOR et al., 2010). Posteriormente, as plantas podem apresentar

outros sintomas como folhas de ramos sintomáticos curvadas, de tamanho reduzido, nervuras salientes e escurecidas. Os frutos produzidos em ramos sintomáticos possuem tamanho reduzido, são assimétricos e de maturação irregular, caem prematuramente, com uma redução da produção de até 100% dependendo da proporção da copa que é afetada (BASSANEZI et al, 2012). Outra característica que pode ser observada nos frutos é a presença de sementes abortadas e vasos escurecidos (BOVÉ, 2006; BELASQUE JUNIOR et al., 2010).

O primeiro levantamento oficial da incidência da doença no Brasil foi realizado no ano de 2008 e mostrou que 0,61% das árvores estavam infectadas. Esse número foi aumentando ao longo dos anos, e em 2015 atingiu 17,89% (FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA, 2020b). Entre 2015 e 2020, a curva de progressão do HLB foi se estabilizando devido ao aprendizado do setor em relação ao manejo do inseto vetor, tais como: monitoramento da presença do inseto, inspeção e erradicação de plantas doentes, pulverizações frequentes na propriedade, ações externas de pulverização e erradicação de plantas, manejo regional, entre outros (BASSANEZI et al., 2020). De acordo com o levantamento realizado em 2020, a doença está presente em 20,87% das laranjeiras do cinturão citrícola de São Paulo e triângulo mineiro (FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA, 2020b) (Figura 1).

Figura 1. Levantamento do progresso temporal da incidência de plantas com sintomas de HLB no estado de São Paulo.



(Fonte: Fundecitrus, 2020)

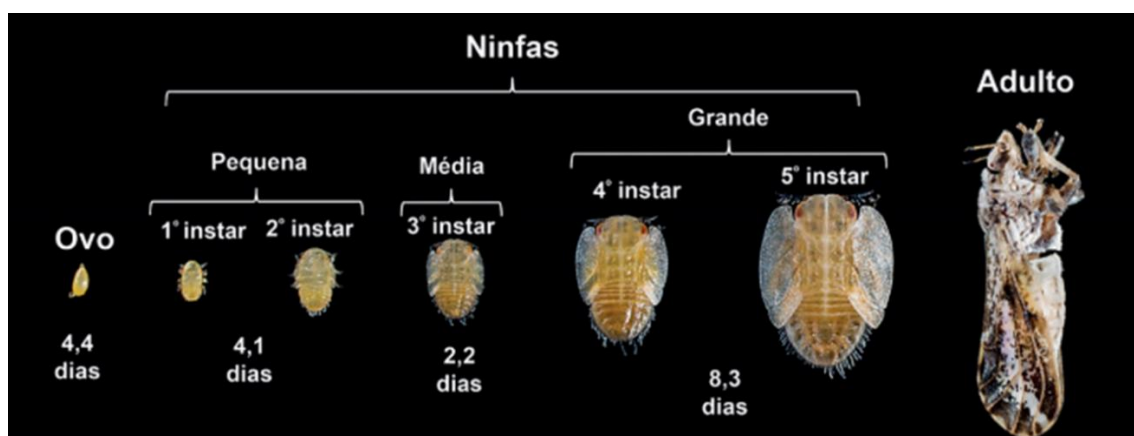
1.3 O inseto vetor *Diaphorina citri*

As bactérias associadas ao HLB são transmitidas entre plantas cítricas pelo psíldeo-asiático-dos-citros (ACP) *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), inseto vetor de *Ca. L. asiaticus* (CAPOOR et al., 1967; CHEN et al., 1973) e *Ca. L. americanus* (YAMAMOTO et al., 2006) e por *Trioza erytreae* Del Guercio (Hemiptera: Triozidae), inseto vetor de *Ca. L. africanus* (MCCLEAN & OBERHOLZER, 1965).

Psíldeos são hemimetábolos: os insetos adultos podem medir cerca de 2 a 3 mm de comprimento, possuindo asas amarronzadas. Os ovos têm formato oval e coloração amarela clara, quando recém depositados. Os psíldeos passam por cinco instares para completar o seu ciclo de desenvolvimento e as ninfas são

achatadas e de coloração laranja-amareladas (FRENCH et al., 2001), em ambiente controlado, o tempo decorrente entra as fases ninfais até que o psíldeo chegue na fase adulta é de aproximadamente 19 dias. (Figura 2).

Figura 2. Fases do desenvolvimento de *D. citri*: ovo, ninfa (1º a 5º instares) e adulto.



(Fonte: Fundecitrus, 2021)

Os estádios iniciais são menos móveis, movendo-se somente quando perturbados ou quando há competição por espaço, porém as ninfas mais desenvolvidas e os adultos deslocam-se com maior facilidade e são alados (HALL et al., 2012). As fêmeas de *D. citri*, após desenvolvimento de seu aparelho reprodutor, tornam-se férteis por toda sua vida, com intensidades de oviposição variadas, dependendo da temperatura, umidade relativa (UR) do ambiente e planta hospedeira (HALL et al., 2012; NAVA et al., 2007). De forma geral, as posturas de fêmeas jovens iniciam-se um ou dois dias após o acasalamento (WENNINGER & HALL, 2008). Em todas as fases de vida os psíldeos produzem uma substância excretora branca, conhecida como 'honey-dew' (TSAI & LIU, 2000).

A ocorrência de *D. citri* é reportada no Brasil desde a década de 1940 (LIMA, 1942), enquanto era considerada uma praga secundária para a citricultura e seu controle era realizado apenas sob altas infestações. O primeiro relato de HLB no Brasil foi em julho de 2004 no município de Araraquara, São Paulo (COLETTA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005a) e *D. citri* tornou-se uma das principais pragas da citricultura. Está presente nos pomares durante o ano todo, com pico populacional nos períodos quentes e úmidos e durante os fluxos vegetativos das plantas hospedeiras da família Rutaceae, principalmente plantas de citros e murta (*Murraya paniculata* (L.) Jack (Rutaceae)) (YAMAMOTO et al., 2001), o que proporciona condições adequadas para reprodução desse inseto vetor, que ocorre preferencialmente em brotos (CIFUENTES-ARENAS et al., 2018).

A disseminação do HLB nos pomares brasileiros e outros países está associada a dois mecanismos espaciais de dispersão do psílídeo, a curtas e longas distâncias. A dispersão a curtas distâncias, em um raio de aproximadamente 50 metros, ocorre infecções secundárias da doença, ou seja, dentro do mesmo talhão e entre plantas próximas. Já a longas distâncias (até 3,5 km da fonte de inóculo) ocorrem infecções primárias do HLB, ou seja, transmissão da doença por psílídeos infectivos oriundos de fontes externas à propriedade (BASSANEZI et al., 2020).

A infecção primária é a mais preocupante para os produtores de citros, haja visto que, as propriedades comerciais que adotam o manejo do HLB corretamente realizam o controle do inseto vetor em intervalos máximos de 15 dias, período este inferior ao ciclo ovo-adulto de *D. citri*. Esse manejo impede que gerações sucessivas do inseto ocorram no interior da propriedade,

reduzindo a infecção secundária (BASSANEZI et al., 2013). TOMASETO et al. (2015) verificou que a presença de brotações nas plantas cítricas resulta em menor dispersão de *D. citri*, devido ao fato de ser o local adequado para alimentação e oviposição, contudo, na ausência de brotações, o inseto tende a se dispersar por distâncias até três vezes maiores.

Uma característica importante em relação ao comportamento de dispersão do psílídeo é a maior concentração do inseto nas plantas da periferia dos pomares e talhões, que se reduz gradativamente à medida que se avança para o interior dos talhões (ASATO, 2018). BOINA et al. (2009) quantificou a dispersão de *D. citri* por meio da técnica de imunomarcadores, e observaram que do total de insetos migrantes capturados em armadilhas adesivas amarelas, 60 a 66% foram capturados nas plantas localizadas na primeira linha de plantio presente na borda de talhões vizinhos, 19 a 24% a 40 m da borda e 10 a 21% a 90 m da borda. Estes gradientes na população de psílídeo e na infestação de brotos, demonstram resultados semelhantes ao estudo de SÉTAMOU & BARTELS (2015), que encontraram maiores níveis de infestação em brotos assim como maiores densidades populacionais do inseto nas plantas da periferia dos talhões, seguidas pelas plantas adjacentes a cerca de 7 m de distância, reduzindo em 50% nas plantas no interior do talhão, a cerca de 40 m da periferia. Esses resultados corroboram ao levantamento de greening realizado em 2020, onde verificou-se que 76% das plantas doentes estavam presentes nas bordas do pomar, correspondendo a uma distância de até 100 metros das divisas da propriedade (FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA, 2020b).

Um gargalo no manejo do HLB, é o fato de que ainda na fase assintomática da doença pode ocorrer a aquisição de *Ca. L. asiaticus* pelo

psílídeo, acelerando a ciclo de disseminação (LEE et al., 2015), e o período decorrente entre a introdução do inóculo em laranjeiras e o aparecimento dos sintomas é variável, levando entre quatro meses a um ano para que seja possível a detecção visual dos sintomas (BOVÉ, 2006; FOLIMONOVA & ACHOR, 2010).

A relação das Liberibactérias com o ACP é persistente e propagativa, ou seja, a bactéria possui a capacidade de se multiplicar no interior do inseto e coloniza-o de maneira sistêmica, ocorrendo a sua multiplicação em órgãos como glândulas salivares, canal alimentar e intestino (AMMAR et al., 2016), com maior título bacteriano no canal alimentar e nas glândulas salivares (XU et al., 1988; AMMAR et al., 2011a, b). A infecção e multiplicação da bactéria no inseto ocorrem desde os estágios ninfais (4º e 5º instares), até a fase adulta (HUNG et al., 2004). Ninfas adquirem a bactéria com maior eficiência em relação aos adultos, e adultos que adquiriram a bactéria nas fases de ninfa transmitem com maior sucesso a bactéria em relação à aquisição na fase adulta (AMMAR et al., 2016; INOUE et al., 2009; PELZ-STELINSKI et al., 2010).

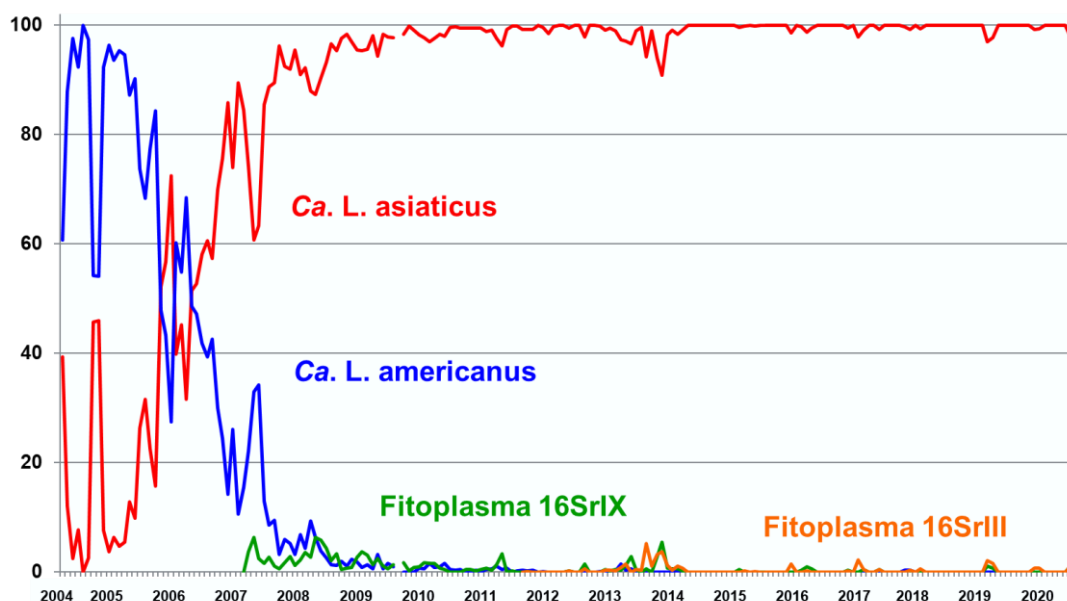
A capacidade de multiplicação da bactéria dentro do inseto está diretamente relacionada a transmissão (XU et al., 1988; INOUE et al., 2009; PELZ-STELINSKI et al., 2010). Resultados preliminares obtidos no Fundecitrus têm demonstrado altas taxas de aquisição de Las por adultos de *D. citri*, diferente do relatado por PELZ-STELINSKI et al. (2010) e AMMAR et al. (2016), muito provavelmente pela utilização de tecidos mais tenros nas pesquisas do Fundecitrus, bem como do estágio vegetativo V3 e em temperatura adequada de aquisição e multiplicação da bactéria (Lopes, SA. Fundecitrus, comunicação pessoal). Assim, a aquisição de Las por *D. citri* na forma ninfal e adulta é passível de ser estudada, com relação aos aspectos moleculares do presente estudo.

1.4 Interação entre as Liberibactérias do HLB e seus hospedeiros

Diversos aspectos referentes à infecção e multiplicação de *Liberibacter* em *D citri*, bem como em laranjeira doce, permanecem desconhecidos (INOUE et al., 2009; HAAPALAINEN, 2014). Sabe-se que bactérias patogênicas em plantas geralmente apresentam alterações em níveis transcricionais no hospedeiro (CHOWDHURY & SAHU., 1996), entretanto, são poucos os trabalhos de interação entre *Liberibacter* e seus hospedeiros, com foco nas Liberibactérias. YAN et al. (2013) compararam a expressão global de 381 genes de Las em psílídeos adultos e em plantas. Ademais, a expressão foi avaliada por RT-qPCR e não de forma global, como é passível de se avaliar utilizando ferramenta de sequenciamento de nova geração (NGS), como em análise transcriptômica.

Quando o HLB foi relatado no Brasil, havia predomínio de Lam e menor porcentagem de plantas afetadas por Las (TEIXEIRA et al., 2005b). A partir de 2007 correu uma mudança na prevalência, com predominância de Las em detrimento de Lam (Figura 2; LOPES et al., 2009a), sendo que atualmente mais de 99,9% das amostras de campo com HLB são causadas por Las (BASSANEZI et al., 2020).

Figura 3. Proporção de amostras de citros positivas para *Ca. L. asiaticus* (Las), *Ca. L. americanus* (Lam), Fitoplasma do grupo 16SrIX e do grupo 16SrIII no serviço de diagnóstico de HLB (103 mil amostras, 2004 a 2020).



(Fonte: Nelson A. Wulff/Fundecitrus)

A mudança na prevalência de Las e de Lam pode estar associada a fatores ambientais, hospedeiros ou comportamentais das bactérias: i) Las atinge concentrações dez vezes maior em relação a Lam em laranja doce (LOPES et al., 2009a). Este fator pode influenciar a aquisição de Las por *D. citri* e favorecer sua dispersão em relação a Lam; entretanto, afirma-se que ii) Las e Lam possuem taxas semelhantes de aquisição pelo psíldeo (NASCIMENTO, 2010). Adicionalmente, há diminuição na concentração de Lam quando a planta está a 32 °C, inclusive com remissão de sintomas, enquanto em Las somente há redução da detecção de Lam a 38 °C (LOPES et al., 2009b). Mesmo assim, a diminuição progressiva da população de Lam nos pomares ocorreu em todas as

regiões citrícolas do estado de São Paulo, mesmo com a variação de temperatura existente entre as regiões sul, centro e norte.

Bactérias podem evoluir conjuntamente com os organismos que habitam, ou dominar outras espécies que ocupam o mesmo nicho e competindo pelo *pool* de recursos (nutrientes) ou espaço (HIBBING et al., 2010). Além disso, existe a competição ativa, como a produção de toxinas antimicrobianas que favorece a dominância ou sobrevivência de algumas cepas. Um exemplo é a produção de colicina por *Escherichia coli*, uma proteína tóxica, conferindo uma vantagem a bactéria em relação à outras espécies (KERR et al., 2002). O conhecimento dessa interação pode auxiliar na compreensão da emergência ou declínio de algumas espécies. É o caso da possível interação entre *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus*, podendo haver vantagem competitiva de uma espécie em relação a outra, notadamente onde a coinfeção ocorra, seja ela em laranjeiras, ou no inseto.

1.5 Profagos e Liberibactérias

Bacteriófagos são vírus que infectam bactérias, sendo comuns em bactérias fitopatogênicas (VARANI et al., 2013) e quando tem seu genoma integrado no cromossomo bacteriano são então denominados profagos (CASJEANS et al., 2003). Em muitos genomas bacterianos os profagos influenciam a patogenicidade e na formação de biofilme bacteriano (BOYD e BRÜSSOW, 2002).

No genoma de *Ca. L. asiaticus* foram caracterizados inicialmente dois profagos, SC1 e SC2 (tipos 1 e 2) (ZHANG et al., 2011) e posteriormente foi identificado outro profago, denominado de tipo 3 (ZHENG et al., 2018). A

ocorrência de profagos em Las foi amplamente estudada na China (ZHENG et al., 2016, 2018) e no Brasil (SILVA et al., 2019). YAN et al. (2013) identificaram genes de Las com expressão diferencial no psílídeo e na planta, mas somente três genes dos fagos de Las foram avaliadas.

A participação de genes dos profagos das Liberibactérias na patologia do HLB foi investigada (JAIN et al., 2015). Fato marcante é a sua presença nas Liberibactérias associadas a doenças de plantas: profagos de mesmo tipo, com diferentes graus de sintenia e conteúdo gênico foram descritos em *Ca. L. asiaticus* (DUAN et al., 2009; ZHENG et al., 2018; LIU et al., 2020) em *Ca. L. solanacearum* (LIN et al., 2011), *Ca. L. americanus* (WULFF et al., 2014) e *Ca. L. africanus* (LIN et al., 2015). Resquícios de profagos (tipo 4) também são encontrados nestes genomas (DOMINGUEZ-MIRAZO et al., 2019; THAPA et al., 2020; WULFF et al., 2014), inclusive na linhagem Las Ishi-1 que não tem os profagos dos tipos 1, 2 e 3, mas não são encontrados em *L. crescens* (LEONARD et al., 2012). Notadamente, *L. crescens* é cultivável *in vitro*, mas não é associada a nenhuma doença, muito embora tenha sido isolada de mamoeiro (FAGEN et al., 2014).

Há relatos de genes de profagos infectando bactérias e que modulam sua competitividade: *Clavibacter michiganensis* hospeda os profagos CMP1 e CN77 que produzem uma endolisina específica para a parede celular desta bactéria, sem afetar outras espécies (WITTMANN et al., 2010). Bacteriocinas são proteínas antibacterianas que atuam em linhagens proximalmente relacionadas, formando poros na membrana interna ou atuando como nucleases nas bactérias alvo. O bacteriófago ϕ CTX de *Pseudomonas aeruginosa* codifica uma citotoxina formadora de poro que funciona como bacteriocina (NAKAYAMA et al., 1999). É

notável a presença em Las de uma possível bacteriocina com semelhança a ‘colicina Ia’ no profago SC1 (gp_060), enquanto um gene para uma proteína de imunidade à colicina ocorre no profago SC2 (gp_255) (ZHANG et al., 2011). Para as bactérias fastidiosas como *Liberibacter* e *Xylella fastidiosa*, o patógeno pode obter vantagem com a expressão de bacteriocinas e sobressair frente às outras populações da espécie, de espécies proximalmente relacionadas, ou frente às populações de endofíticos (ARAÚJO et al., 2002) ou endossimbiontes e outras bactérias nos insetos vetores. Nossa linha de pesquisa busca identificar genes dos profagos expressos pela bactéria no inseto vetor via sequenciamento de bibliotecas de RNA (RNA-Seq), como forma de gerar conhecimento da fase inicial de infecção por Las no psíldeo, bem como informações sobre a expressão de genes dos profagos em Las no Brasil.

1.6 Atualidade e perspectivas para o manejo do HLB e de *Diaphorina citri*

O fator que mais dificulta o controle e consequente dispersão do HLB é o tempo que decorre entre a inoculação da bactéria, e a manifestação dos primeiros sintomas foliares. A manifestação dos sintomas depende do modo de inoculação do patógeno – ao redor de quatro meses quando a inoculação é feita por enxertia de ramos doentes (LOPES & FRARE, 2008) e cinco meses quando a inoculação é feita por psíldeos infectivos (CANALE et al., 2019). Este longo e variável período de incubação dificulta a detecção de plantas doentes no campo e a adoção das práticas eficazes de manejo (LOPES & FRARE, 2008).

Como medida de supressão da doença, é recomendado o manejo regional do HLB e de *D. citri* somado às medidas individuais adotadas pelos citricultores. Dentro deste contexto, recomenda-se: intensificar as pulverizações

nas bordas dos pomares comerciais, pois é a área com maior incidência de *D. citri*; manter as plantas bem nutridas; eliminar plantas doentes que servem como fonte de inóculo dos pomares e nas cercanias destes; plantar mudas sadias provenientes de viveiros telados e certificados; realizar o planejamento e renovação do plantio em locais com baixa incidência de HLB; fazer parcerias com vizinhos para controle do inseto vetor e pulverizações de inseticidas de forma sincronizada entre propriedades próximas; inspeção visual frequente para detecção das plantas doentes e *D. citri*; monitorar insetos adultos por meio de armadilhas adesivas amarelas; realizar o controle químico por aplicações via drench com inseticidas sistêmicos e foliares com inseticidas recomendados para a cultura e praga alvo; liberação do ectoparasitoide *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae) em locais livres de pulverizações, áreas abandonadas e quintais com plantas hospedeiras e a participação dos produtores no manejo regional do HLB (FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA, 2020B).

Estudos visando novas táticas para o manejo de *D. citri* se intensificaram devido aos impactos e perdas ocasionadas pelo HLB no mundo (GRAFTON CARDWELL et al., 2013). Neste sentido, diversas táticas de manejo de *D. citri* vêm sendo estudadas, como o controle físico por meio de mulching refletivo (CROXTON & STANSLY, 2013), aplicação de caulim processado nas bordas dos pomares (MIRANDA et al., 2018), controle biológico com adoção de fungos entomopatogênicos (PADULLA, 2007; PINTO et al., 2012; KUMAR et al., 2017), utilização de murta como planta-isca (TOMASETO et al., 2019), uso de inseticida botânico a base de *Piper aduncum* (VOLPE et al., 2015) e controle biológico em áreas externas com liberações massais de *T. radiata* (MARIN, 2019; DINIZ et al.,

2020). Porém, mesmo com diversas táticas de controle conhecidas, o controle químico é a ferramenta mais eficiente adotada pelos citricultores para o combater o inseto vetor e manejo do HLB (MIRANDA & AYRES, 2020). O último possibilita a seleção de populações resistentes, contaminação de água e lençol freático, bem como do colaborador responsável pelo preparo de calda e pulverizações

Para mitigar ações de manejo que causam impactos ambientais, uma solução seria o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas voltadas ao melhoramento de plantas hospedeiras e resistentes ao HLB e/ou ACP (BASSANEZI et al., 2020). No entanto, há escassez de informações sobre variedades cítricas resistentes ao HLB (FOLIMONOVA et al., 2009), o que têm dificultado tanto o manejo mais sustentável, bem como o melhoramento genético. São relatadas que algumas espécies de Rutaceae possuem determinado grau de resistência ou tolerância (RAMADUGU et al., 2016; ALVES et al., 2021; HUANG et al., 2021).

No contexto trófico planta hospedeira de ACP/HLB e epidemiologia da doença, uma alternativa factível é o uso de plantas cítricas comerciais hospedeiras do inseto vetor resistentes a bactéria e/ou ACP. Diante do contexto apresentado, objetiva-se melhorar o entendimento da relação/prevalência das Liberibactérias na planta. Além disso, procuramos investigar como se dá sua interação com inseto, principalmente em fases iniciais da infecção. As atividades desenvolvidas aqui fornecerão dados que potencialmente auxiliarão na identificação de alvos para transformação genética em laranjeira doce e/ou outros hospedeiros do inseto vetor.

REFERÊNCIAS

- ACHOR, D.S.; ETXEBERRIA, E.; WANG, N.; FOLIMONOVA, S.Y.; CHUNG, K.R.; ALBRIGO, L.G. (2010). Sequence of anatomical symptom observations in citrus affected with Huanglongbing disease. *J. Plant Pathol.*, 9: 56-64.
- AMMAR, E.D.; ROBERT, G.; SHATTERS, J.R.; LYNCH, C.; HALL, D.G. (2011a). Detection and relative titer of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in the salivary glands and alimentary canal of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) vector of citrus Huanglongbing disease. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 104: 526-533.
- AMMAR, E.D.; SHATTERS, JR. R.G.; HALL, D.G. (2011b). Localization of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, associated with citrus Huanglongbing disease, in its psyllid vector using fluorescence in situ hybridization. *J. Phytopathol.*, 159: 726-734.
- AMMAR, E.D.; RAMOS, J.E.; HALL, D.G.; DAWSON, W.O.; SHATTERS, JR. R.G. (2016). 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*, 11 (7), e0159594.
- ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI, JR. W.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VUURDE, J.W.; AZEVEDO, J.L. (2002). Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 4906-4914.
- ASATO, F.P. (2018). Eficiência da pulverização de inseticida na borda dos talhões no manejo do huanglongbing. 33 p. Dissertação de Mestrado (MasterCitrus) - Fundo de Defesa da Citricultura, Araraquara, SP.
- BASSANEZI, R.B.; MONTESINO, L.B.; BUSATO, L.A.; STUCHI, E.S. (2006) Damages caused by Huanglongbing in sweet orange yield and quality in São Paulo. In: Greening International Workshop, Ribeirão Preto – São Paulo. Proceedings of the Huanglongbing. p. 39.
- BASSANEZI, R.B. (2012). Manejo do Huanglongbing dos citros pela redução do inóculo e controle do vetor: dificuldades e avanços. In: XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2008, Bento Gonçalves-RS.
- BASSANEZI, R.B.; MONTESINO, L.H.; GIMENES-FERNANDES, N.; YAMAMOTO, P.T.; GOTTWALD, T.R.; AMORIM, L.; BERGAMIN-FILHO, A. (2013). Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of huanglongbing in young sweet orange plantings. *Plant Dis.*, 97: 789-796.
- BASSANEZI, R.B.; LOPES, S.A.; MIRANDA, M.P; WULFF, N.A; VOLPE, H.X.L.; AYRES, A.J. (2020). Overview of citrus huanglongbing spread and management strategies in Brazil. *Trop. Plant Pathol.*, 45: 251-264.

BELASQUE, JR. J.; BASSANEZI, R.B.; YAMAMOTO, P.T.; AYRES, A.J.; TACHIBANA, A.; VIOLANTE, A.R.; TANK, JR. A.; DI GIORGI, F.; TERSI, F.E.A.; MENEZES, G.M.; DRAGONE, J.; JANK, JR. R.H.; BOVÉ, J.M. (2010). Lessons from Huanglongbing management in São Paulo state, Brazil. *J. Plant Pathol.*, 92: 285-302.

BOINA, D.R.; MEYER, W.L.; ONAGBOLA, E.O.; STELINSKI, L.L. (2009). Quantifying dispersal of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) by immunomarking and potential impact of unmanaged groves on commercial citrus management. *Environ. Entomol.*, 38: 1250-1258.

BOVÉ, J.M. (2006). Huanglongbing: A destructive, newly emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Pathol.*, 88: 7-37.

BOYD, E.F.; BRÜSSOW, H. (2002). Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. *Trends Microbiol.*, 10: 521-529.

CANALE, M.C.; KOMADA, K.M.A.; LOPES, J.R.S. (2019). Latency and incubation of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in citrus after vector inoculation. *Trop. Plant Pathol.*, 45: 320-326.

CAPOOR, S.P.; RAO, D.G.; VISWANATH, S.M. (1967). *Diaphorina citri* Kuwayama, a vector of the Greening disease of citrus in India. *Indian J. Agric. Sci.*, 37: 572-576.

CASJEANS, S. (2003) Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Mol. Microb.*, 49(2):277-300.

CHEN, J., PU, X., DENG, X., LIU, S., LI, H. & CIVEROLO, E. 2009. A phytoplasma related to '*Candidatus Phytoplasma asteris*' detected in citrus showing *huanglongbing* (Yellow Shoot Disease) symptoms in Guangdong, P. R. China. *Phytopathology*. 99: 236-242.

CHEN, M.H.; MIYAKAWA, T.; MATSUI, C. (1973). Citrus Likubin pathogens in salivary glands of *Diaphorina citri*. *Phytopathol.*, 63: 194-195.

CIFUENTES-ARENAS, J.C.; GOES, A.; MIRANDA, M.P.; BEATTIE, G.A.C.; LOPES, S.A. (2018). Citrus flush shoot ontogeny modulates biotic potential of *Diaphorina citri*. *PLoS ONE*, 13: 1-17.

CHOWDHURY, R.; SAHU, G.K.; DAS, J. (1996). Stress response in pathogenic bacteria. *J. Biosci.*, 21: 149-160.

COLETTA FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; DE NEGRI, J.D.; POMPEU, JR. J.; MACHADO, M.A. (2004). First report of the causal agent of Huanglongbing ("*Candidatus Liberibacter asiaticus*") in Brazil. *Plant Dis.*, 88: 1382.

CREECY, J.; CONWAY, T. (2015). Quantitative bacterial transcriptomics with RNA-seq. *Curr. Opin. Microbiol.*, 23: 133-140.

CROXTON, S.D., STANSLY, P.A. (2013). Metalized polyethylene mulch to repel Asian citrus psyllid, slow spread of huanglongbing and improve growth of new citrus plantings. *Pest Manag. Sci.*, 70: 318-323.

CUI, X., LIU, K., ATTA, S., ZENG, C., ZHOU, C.Y., WANG, X. (2020) Two unique prophages of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” strains from Pakistan. *Phytopathology*. 10.1094/PHYTO-10-20-0454-SC

DINIZ, A.J.F., GARCIA, A.G., ALVES, G.R., REIGADA, C., VIEIRA, J.M., PARRA, J.R.P. (2020). The Enemy is Outside: Releasing the Parasitoid *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) in External Sources of HLB Inocula to Control the Asian Citrus Psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Neotrop. Entomol.*, 49: 250-257.

DOMINGUEZ-MIRAZO, M., JIN, R., WEITZ, J.S. (2019) Functional and comparative genomic analysis of integrated prophage-like sequences in “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”. *mSphere*. 4: e00409-19.

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. (2009). Complete genome sequence of Citrus Huanglongbing bacterium, ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ obtained through metagenomics. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 22: 1011-1020.

FAGEN, J.R.; LEONARD, M.T.; COYLE, J.F.; MCCULLOUGH, C.M.; DAVIS-RICHARDSON, A.G.; DAVIS, M.J.; TRIPLETT, E.W. (2014). *Liberibacter crescens* gen. nov., sp. nov., the first cultured member of the genus *Liberibacter*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64: 2461-2466.

FRENCH, J.V.; KAHLKE, C.J.; DA GRAÇA, J.V. (2001). First Record of the Asian Citrus Psylla, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera:Psyllidae), in Texas. *Subtrop. Plant Sci.*, 53: 14-15.

FOLIMONOVA, S.Y.; ACHOR, D.S. (2010). Early events of citrus greening (Huanglongbing) disease development at the ultrastructural level. *Phytopathol.*, 100: 949-958.

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

FUNDECITRUS, 2020a. Inventário de árvores e estimativa da safra de laranja do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste mineiro. (Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pesrelatorios/2020>). Acesso em: 01/08/2020.

FUNDECITRUS, 2020b. Levantamento da incidência das doenças dos citros: greening, CVC e cancro cítrico no cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro. Revista Fundecitrus, Araraquara, 67 p.

GRAFTON-CARDWELL, E.E.; STELINSKI, L.L.; STANSKY, P.A. (2013). Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens. Ann. Rev. Entomol., 58: 413-432.

GRAHAM, J.; GOTTFELD, T.; SETAMOU, M. (2020). Status of huanglongbing (HLB) outbreaks in Florida, California and Texas. Trop. Plant Pathol., 45: 265-278.

HAAPALAINEN, C.M. (2014). Biology and epidemics of *Candidatus Liberibacter* species, psyllid-transmitted plant-pathogenic bacteria. Ann. Appl. Biol., 165: 172-198.

HAAS, B.J.; CHIN, M.; NUSBAUM, C.; BIRREN, B.W.; LIVNY, J. (2012). How deep is deep enough for RNA-Seq profiling of bacterial transcriptomes? BMC Genomics, 13: 734.

HALBERT, S.E. (2005). The discovery of huanglongbing in Florida. In: 2nd International citrus Canker and huanglongbing Research Workshop, 2005, Orlando. Proceedings. Florida Citrus Mutual, Orlando, p. 53.

HALL, D.G.; RICHARDSON, M.L.; EL-DESOUKY, A.; HALBERT, S.E. (2012). Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. Entomol. Exp. Appl., 146: 207-223.

HIBBING, M.E.; FUQUA, C.; PARSEK, M.R.; PETERSON, S.B. (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. Nat. Rev. Microbiol., 8: 15-25.

HUNG, T.H.; HUNG, S.C.; CHEN, C.N.; HSU, M.H.; SU, H.J. (2004). Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus Huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector-pathogen relationships. Plant Pathol., 53: 96-102.

IBANEZ, F.; LEVY, J.; TAMBORINDEGUY, C. (2014). Transcriptome analysis of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" in its Psyllid Vector, *Bactericera cockerelli*. PLoS ONE, 9 (7): e100955.

INOUE, H.; OHNISHI, J.; ITO, T.; TOMIMURA, K.; MIYATA, S.; IWANAMI, T.; ASHIHARA, W. (2009). Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. Ann. Appl. Biol., 155: 29-36.

JAGOUÉIX, S.; BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. (1994). The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria. Int. J. Syst. Bacteriol., 44: 379-386.

JAIN, M.; FLEITES, L.A.; GABRIEL, D.W. (2015). Prophage-encoded peroxidase in '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' is a secreted effector that suppresses plant defenses. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 28: 1330-1337.

KERR, B.; RILEY, M.A.; FELDMAN, M.W.; BOHANNAN, J.M. (2002). Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock–paper–scissors. *Nature*, 418: 171-174.

KATOH, H.; MIYATA, S.; INOUE, H.; IWANAMI, T. (2014). Unique features of a Japanese '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' strain revealed by whole genome sequencing. *PLoS ONE*, 9 (9): e106109.

KERR, B., RILEY, M.A., FELDMAN, M.W., BOHANNAN, J.M. (2002). Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock–paper–scissors. *Nature* 418: 171-174.

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

KUMAR, V.; AVERY, P.B.; AHMED, J.; CAVE, R.D.; MCKENZIE, C.L.; OSBORNE, L.S. (2017). Compatibility and Efficacy of *Isaria fumosorosea* with Horticultural Oils for Mitigation of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Insects*, 8: 119.

LAFLÉCHE, D.; BOVÉ, J.M. (1970). Structures de type mycoplasme dans les feuilles d'orange atteints de la maladie du "greening". *Comptes Rendus de l'Académie des Sci.*, 270: 1915-1917.

LEE, J.A.; HALBERT, S.E.; DAWSON, W.O.; ROBERTSON, C.J.; KEESLING, J.E.; SINGER, B.H. (2015). Asymptomatic spread of Huanglongbing and implications for disease control. *PNAS*, 112: 7605-7610.

LEONARD, M.T.; FAGEN, J.R.; DAVIS-RICHARDSON, A.G.; DAVIS, M.J.; TRIPLETT, E.W. (2012). Complete genome sequence of *Liberibacter crescens* BT-1. *Stand. Genom. Sci.*, 7: 271-283.

LIMA, A.M.C. (1942). *Insetos do Brasil*, 3º Tomo, Homópteros. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia. 324 p. (Série Didática, 4).

LIN, H.; LOU, B.; GLYNN, J.M.; DODDAPANENI, H.; CIVEROLO, E.L.; CHEN, C.; DUAN, Y.; ZHOU, L.; VAHLING, C.M. (2011). The complete genome sequence of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*', the bacterium associated with Potato Zebra Chip disease. *PLoS ONE*, 6 (4): e19135.

LIN, H.; PIETERSEN, G.; HAN, C.; READ, D.A.; LOU, B.; GUPTA, G.; CIVEROLO, E.L. (2015). Complete genome sequence of "*Candidatus Liberibacter africanus*," a bacterium associated with citrus Huanglongbing. *Genome Announc.*, 3 (4): e00733-1.

LOPES, S.A.; BERTOLINI, E.; FRARE, G.F.; MARTINS, E.C.; WULFF, N.A.; TEIXEIRA, D.C.; FERNANDES, N.G.; CAMBRA, M. (2009a). Graft transmission efficiencies and multiplication of '*Candidatus Liberibacter americanus*' and '*Ca. Liberibacter asiaticus*' in citrus plants. *Phytopathol.*, 99: 301-306.

LOPES, S.A.; FRARE, G.F. (2008). Graft transmission and cultivar reaction of citrus to '*Candidatus Liberibacter americanus*'. *Plant Dis.*, 92: 21-24.

LOPES, S.A.; FRARE, G.F.; BERTOLINI, E.; CAMBRA, M.; FERNANDES, N.G.; AYRES, A.J.; MARIN, D.R.; BOVÉ, J.M. (2009b). Liberibacters associated with citrus Huanglongbing in Brazil: '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' is heat tolerant, '*Ca. L. americanus*' is heat sensitive. *Plant Dis.* 93: 257-62.

MARIN, D.R. (2019). Densidade e raio de dispersão de *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae) para o controle de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) em pomares cítricos. 28 p. Dissertação de Mestrado (MasterCitrus) - Fundo de Defesa da Citricultura, Araraquara, SP.

MCCLEAN, A.P.D.; OBERHOLZER, P.C.J. (1965). Citrus psylla, a vector of the greening disease of sweet orange. *S. Afr. J. Agric. Sci.*, 8: 297-298.

Miranda MP, Ayres AJ. Asian Citrus Psyllid Management in São Paulo, Brazil. In: Qureshi J, Stansly PA, organizers. Asian Citrus Psyllid: Biology, Ecology and Management of Huanglongbing vector. 1st ed. Wallingford: CABI; 2020 pp. 210-221.

MIRANDA, M.P.; ZANARDI, O.Z.; TOMASETO, A.F.; VOLPE, H.X.L.; GARCIA, R.B.; PRADO, E. (2018). Processed kaolin affects the probing and settling behavior of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Pest Manag. Sci.*, 74: 1964-1972.

NASCIMENTO, F.E. (2010). Estudos sobre aquisição e concentração de "*Candidatus Liberibacter asiaticus* e "*Candidatus Liberibacter americanus*" em *Diaphorina citri* Kuwayama. 87 p. Dissertação de Mestrado (Entomologia) – Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' - ESALQ/USP, Piracicaba, São Paulo.

NAKAYAMA, K.; KANAYA, S.; OHNISHI, M.; TERAOKA, Y.; HAYASHI, T. (1999). The complete nucleotide sequence of ϕ CTX, acytotoxin-converting phage of *Pseudomonas aeruginosa*: implications for phage evolution and horizontal gene transfer via bacteriophages. *Mol. Microbiol.*, 31: 399-419.

NAVA, D.E.; TORRES, M.L.G.; RODRIGUES, M.D.L.; BENTO, J.M.S.; PARRA, J.R.P. (2007). Biology of *Diaphorina citri* (Hem.: Psyllidae) on different hosts and different temperatures. *J. Appl. Entomol.*, 131: 9-10.

NEVES, M.F. (2016). Vai agronegócio! 25 anos cumprindo missão vitoriosa. São Paulo: Canaeste. 538 p.

NEVES, M.F.; Trombin, V.G. (2017). Anuário da citricultura 2017. São Paulo: CitrusBR. 57 p.

NEVES, M.F.; Trombin, V.G.; Kalaki, R.B.; Lopes, F.F. (2015). A laranja, do campo ao copo. São Paulo: Atlas. 248 p.

PADULLA, L.F.L. (2007). Estudo de fungos entomopatogênicos para o controle de ninfas do psílídeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). 91 p. Dissertação de Mestrado (Entomologia). Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' - ESALQ/USP, Piracicaba, São Paulo.

PELZ-STELINSKI, K.S.; BRLANSKY, R.H.; EBERT, T.A.; ROGERS, M.E. (2010). Transmission Parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Psyllidae). J. Econ. Entomol., 103: 1531-1541.

PINTO, A.P.F.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; WENZEL, I.M. (2012). Patogenicidade de *Beauveria bassiana* ao psílídeo *Diaphorina citri* e compatibilidade do fungo com produtos fitossanitários. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 47:1673-1680.

RAMADUGU, C.; KEREMANE, M.; HALBET, S.; DUAN, Y. (2016). Long term field evaluation reveals HLB resistance in Citrus relatives. Plant Dis., 100: 1858-1869.

ROONEY, W.M., GRINTER, R.W., CORREIA, A., PARKHILL, J., WALKER, D.C., MILNER, J.J. (2020). Engineering bacteriocin-mediated resistance against the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. Plant Biotechnology Journal. 18:1296-1306.

SÉTAMOU, M.; BARTELS, D.W. (2015). Living on the edges: spatial niche occupation of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), in citrus groves. PLoS ONE, 10:1-21.

SHENDURE J, JI H. 2008. Next-generation DNA sequencing. Nature Biotechnology, 26(10):1135-1145.

SILVA, P.A.; FASSINI, C.G.; SAMPAIO, L.S.; DEQUIGIOVANNI, G.; ZUCCHI, M.I.; WULFF, N.A. (2019). Genetic diversity of *Liberibacter asiaticus* revealed by short tandem repeats and prophage typing indicates population homogeneity in Brazil. Phytopathol., 109: 960-971.

TEIXEIRA, D.C.; AYRES, A.J.; KITAJIMA, E.W.; TANAKA, F.A.O.; DANET, L.; JAGOEIX-EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J.M. (2005a). First Report of a Huanglongbing-Like Disease of Citrus in Sao Paulo State, Brazil and Association of a New *Liberibacter* Species, "*Candidatus Liberibacter americanus*". Plant Dis., 89: 107.

TEIXEIRA, D.C.; DANET, J.L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E.C.; JESUS, JR. M.C.; YAMAMOTO, P.T.; LOPES, S.A.; BASSANEZI, R.B.; AYRES, A.J.;

SAILLARD, C.; BOVÉ, J.M. (2005b). Citrus Huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the “*Candidatus*” *Liberibacter* species associated with the disease. *Mol. Cell. Probes*, 19: 173-179.

TEIXEIRA, D.C.; WULFF, N.A.; MARTINS, E.C.; KITAJIMA, E.W.; BASSANEZI, R.; AYRES, A.J.; EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J.M. (2008). A Phytoplasma Closely Related to the Pigeon Pea Witches'-Broom Phytoplasma (16Sr IX) Is Associated with Citrus Huanglongbing Symptoms in the State of São Paulo, Brazil. *Phytopathol.*, 98: 977-984.

TEIXEIRA, D.C.; WULFF, N.A.; LOPES, S.A.; YAMAMOTO, P.T.; MIRANDA, M.P.; SPOSITO, M.B.; JUNIOR, J.B.; BASSANEZI, R.B. (2010). Characterization and etiology of the bacteria associated with Huanglongbing. *Citrus Research & Technology*, 31: 115-128.

THAPA SP, DE FRANCESCO A, TRINH J, GURUNG FB, PANG Z, VIDALAKIS G, WANG N, ANCONA V, MA W, COAKER G. Genome-wide analyses of *Liberibacter* species provides insights into evolution, phylogenetic relationships, and virulence factors. *Molecular Plant Pathology*, 00:1-16, 2020.

TOMASETO, A.F.; KRUGNER, R.; LOPES, J.R.S. (2015). Effect of plant barriers and citrus leaf age on dispersal of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *J. Appl. Entomol.*, 140: 91-102.

TOMASETO, A.F.; MARQUES, R.N.; FERERES, A.; ZANARDI, O.Z.; VOLPE, H.X.L.; ALQUÉZAR, B.; PEÑA, L.; MIRANDA, M.P. (2019). Orange jasmine as a trap crop to control *Diaphorina citri*. *Sci. Rep.*, 9: 2070.

TSAI, J.H.; LIU, Y.H. (2000). Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on Four Host Plants. *J. Econ. Entomol.*, 93: 1721-1725.

VARANI, A.M.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; NAKAYA, H.I.; SLUYS, M.A.V. (2013). The role of prophage in plant-pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 51: 429-451.

VOLPE, H.X.L.; FAZOLIN, M.; GARCIA, R.B.; MAGNANI, R.F.; BARBOSA, J.C.; MIRANDA, M.P. (2015). Efficacy of essential oil of *Piper aduncum* against nymphs and adults of *Diaphorina citri*. *Pest Manag. Sci.*, 72: 1242-1249.

WENNINGER, E.J.; HALL, D.G. (2008). Importance of multiple mating to female reproductive output in *Diaphorina citri*. *Physiol. Entomol.*, 33: 316-321.

WITTMANN, J.; EICHENLAUB, R.; DREISEIKELMANN, B. 2010. The endolysins of bacteriophages CMP1 and CN77 are specific for the lysis of *Clavibacter michiganensis* strains. *Microbiol.*, 156: 2366-2373.

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. (2014). The complete genome sequence of *Candidatus*

Liberibacter americanus, associated with Citrus Huanglongbing. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 27: 163-176.

WULFF, N.A.; FASSINI, C.G.; MARQUES, V.V.; MARTINS, E.C.; COLETTI, D.A.B.; TEIXEIRA, D.C.; SANCHES, M.M.; BOVÉ, J.M. (2019). Molecular Characterization and Detection of 16SrIII Group Phytoplasma Associated with Huanglongbing Symptoms. *Phytopathol.*, 109: 366-374.

XU, C.F.; XIA, Y.H.; LI, K.B.; KE, C. (1988). Further study of the transmission of citrus huanglongbing by a psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. In: International Organization of Citrus Virologists (IOCV), 10th Conference Proceedings, 2008. Riverside, CA, 10: 243-248.

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.; ABRAHAO, 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.

YAMAMOTO, P.T., PAIVA, P.E.B., GRAVENA, S. (2001). Flutuação populacional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em pomares de citros na região norte do Estado de São Paulo. *Neotrop. Entomol.*, 30: 165-170.

YAN, Q.; SREEDHARAN, A.; WEI, S.; WANG, J.; PELZ-STELINSKI, K.; FOLIMONOVA, S.; WANG, N. (2013). Global gene expression changes in *Candidatus Liberibacter asiaticus* during the transmission in distinct host between plant and insects. *Mol. Plant Pathol.*, 14: 391-404.

ZHOU, C. (2020). The status of citrus Huanglongbing in China. *Trop. Plant Pathol.*, 45: 279-284.

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. (2011). *Ca. Liberibacter asiaticus* carries an excision plasmid prophage and a chromosomally integrated prophage that becomes lytic in plant infections. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 24: 458-468.

ZHENG, Z.; BAO, M.; WU, F.; CHEN, J.; DENG, X. (2016). Predominance of Single Prophage Carrying a CRISPR/cas System in "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" Strains in Southern China. *PLoS ONE*, 11 (1): e0146422.

ZHENG, Z.; BAO, M.; WU, F.; VAN HORN, C.; CHEN, J.; DENG, X. (2018). A type 3 prophage of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' carrying a restriction-modification system. *Phytopathol.*, 108: 454-461.

CAPÍTULO 2

O GENOMA DE *Candidatus Liberibacter asiaticus* É ALTAMENTE TRANSCRITO QUANDO INFECTA O INTESTINO DE *Diaphorina citri*

RESUMO

O psilídeo-asiático dos citrus, *Diaphorina citri*, é o vetor da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las), associada com a mais devastadora doença dos citros, o Huanglongbing. Com a finalidade de explorar as interações moleculares desta bactéria com *D. citri* durante o processo de aquisição do vetor, nós sequenciamos bibliotecas de cDNA obtidas do intestino de psilídeos adultos confinados em brotos saudáveis (S I, S II e S III) e em brotos jovens infectados por Las (Las I (1/2 dias), Las II (3/4 dias), e Las III (5/6 dias)) em plataforma Illumina. Cada tempo de amostragem foi formado por três repetições biológicas para cada condições e foram coletados cem intestinos por amostra, totalizando 18 bibliotecas enriquecidas em mRNAs. As leituras foram filtradas por qualidade e mapeadas contra a linhagem chinesa JXGC Las (NZ_CP019958.1) e a linhagem da Flórida UF506 (HQ377374.1) para a análise da atividade do genoma Las e dos profagos SC1, SC2 e tipo 3 da linhagem Las estudada. A atividade dos genes foi considerada apenas se fossem obtidas leituras mapeadas em pelo menos 2 bibliotecas para cada período de acesso à aquisição contra os genomas selecionados, o que resultou em coberturas de 44,4, 79,9 e 94,5% das sequências de codificação previstas para o isolado JXGC em Las I, Las II e Las III, respectivamente. Esses genes foram classificados principalmente nas seguintes categorias funcionais: produção de energia, metabolismo de aminoácidos, tradução de sinais, parede celular e replicação e reparo de material genético. Pilinas estavam entre os genes mais expressos, independentemente do tempo de aquisição. Além disso, a região do profago teve uma cobertura maior de leituras para os profagos SC1 (tipo 1) e PJXGC-3 (tipo 3), e baixa cobertura na região tardia de SC2 (tipo 2). Em resumo, esta pesquisa apresenta a primeira análise descritiva do transcriptoma de Las nas etapas iniciais da colonização do intestino de *D. citri*.

Palavras-chave: Huanglongbing, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, psilídeo, metatranscritoma, *Diaphorina citri*, profago.

THE GENOME OF *Candidatus Liberibacter asiaticus* IS HIGHLY TRANSCRIBED WHEN INFECTING THE GUT OF *Diaphorina citri*

ABSTRACT

The Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri*, is the vector of the bacterium ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ (Las), associated with the devastating, worldwide citrus disease Huanglongbing. In order to explore the molecular interactions of this bacterium with *D. citri* during the vector acquisition process, we sequenced cDNA libraries obtained from the gut of adult psyllids confined in healthy (SI, SII, and SIII) and in Las-infected young shoots (Las I (1/2 days), Las II (3/4 days), and Las III (5/6 days)) on Illumina platform. In each sampling time three biological replicates were collected, containing one-hundred guts each, totaling 18 libraries enriched in bacterial mRNAs. Reads were quality-filtered and mapped against the Chinese JXGC Las strain (NZ_CP019958.1) and the Floridian strain UF506 (HQ377374.1) for the analysis of the activity of the Las genome and prophages SC1, SC2 and type 3 of the studied Las strain. Gene activity was considered only if reads of at least 2 replicates for each acquisition access period mapped against the selected genomes, which resulted in coverages of 44.4, 79.9 and 94.5% of the JXGC predicted coding sequences in Las I, Las II, and Las III, respectively. These genes were mostly classified in the following functional categories: energy production, amino acid metabolism, signal translation, cell wall, and replication and repair of genetic material. Pilins were among the most highly expressed genes regardless of the acquisition time. Furthermore, the prophage region had a greater coverage of reads for the SC1 (type 1) and PJXGC-3 (type 3) prophages, and low coverage in SC2 (type 2), mostly in the late region. In short, this research presents the first descriptive analysis of Las transcriptome in the initial steps of the *D. citri* gut colonization.

Keywords: Greening, HLB, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, Asian citrus psyllid, metatranscriptome, *Diaphorina citri*, prophage.

1 INTRODUÇÃO

Candidatus Liberibacter asiaticus (Las), uma bactéria Gram-negativa pertencente ao grupo das α -proteobactérias (GARNIER et al., 1984; JAGOUeix, et al., 1994), é o principal agente associado ao Huanglongbing (HLB) (BASSANEZI et al., 2020). O inseto vetor de Las é o psílídeo asiático dos citros (ACP) *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) (CAPOOR et al., 1967; CANALE et al., 2017) e o vetor frequentemente adquire Las em plantas infectadas em áreas adjacentes aos pomares comerciais sadios, com a consequente migração do psílídeo gerando infecções primárias (BERGAMIN FILHO et al., 2016), resultando em danos econômicos por afetar a produção (BASSANEZI et al., 2020). Devido à importância da doença e por não haver métodos curativos para o controle do HLB, a bactéria e o psílídeo são considerados, atualmente, as principais pragas para a citricultura mundial (MIRANDA & AYRES, 2020).

A aquisição de Las pelo psílídeo, além de ocorrer em plantas sintomáticas, também pode ocorrer em plantas assintomáticas durante a fase ninfal, logo após a inoculação de Las na planta por psílídeos infectados (HUNG et al., 2004; PELZ-STELINSKI et al., 2010; CANALE et al., 2017) e a aquisição assintomática durante o estágio de ninfa, dentro de 15 dias após a inoculação por psílídeos infectados, foi descrita como uma forma de dispersão nova e altamente ameaçadora (LEE et al., 2015). A transmissão de Las pelos psílídeos requer, entretanto, um período latente de 16 a 18 dias (CANALE et al., 2017) e sua relação com o psílídeo é persistente e propagativa (AMMAR et al., 2011a; INOUE et al., 2009; CANALE et al., 2017). A aquisição da bactéria pelo psílídeo tem implicação direta na sua eficiência de transmissão e consequentemente na sua disseminação (INOUE et al., 2009; PELZ-STELINSKI et al., 2010; CANALE et al., 2017). O intestino representa a primeira barreira celular que o liberibacter precisa atravessar no psílídeo, para ter acesso à hemolinfa e migrar para as glândulas salivares, permitindo o processo de inoculação e a sua disseminação. Estudos de expressão gênica mostram um padrão

de respostas no intestino, na hemolinfa e nas glândulas salivares de *D. citri* frente à infecção com Las (KRUSE et al. 2017, 2018; LIU et al., 2020). Há estudos exploratórios que relatam alterações transcricionais nas plantas em função da presença de Las em *Catharanthus roseus* (LIU et al., 2019), em folhas (FU et al., 2016; HU et al., 2017; ARCE-LEAL et al., 2020) e frutos de *Citrus* spp. (MARTINELLI et al., 2012), entretanto, nestas interações não foram geradas informações sobre transcritos de Las.

A análise transcricional de Las está restrita a avaliação da expressão gênica via RT-qPCR em psílídeos e em citros, com alterações na expressão de genes relacionados à regulação da transcrição, transporte, secreção, montagem do flagelo, em vias metabólicas e resistência ao estresse, pela avaliação de um grupo selecionado de genes (YAN et al., 2013; PRASAD et al., 2016; THAPA et al., 2020) ou associado a estudos funcionais (FLEITES et al., 2014 JAIN et al., 2015; LI et al., 2017). O transcriptoma de *Ca. L. solanacearum* (Lso) via RNA-Seq em *Bactericera cockerelli* indica uma alta porcentagem de genes expressos, particularmente de possíveis genes envolvidos na transcrição e modificação pós-transcricional, metabolismos de proteínas e chaperonas (IBANEZ et al., 2014). O sequenciamento de bibliotecas de cDNA via RNA-Seq têm sido uma importante ferramenta para estudos de alterações transcricionais bacterianas (CROUCHER & THOMSON, 2010; HAAS et al., 2012; CREECY & CONWAY, 2015). Neste trabalho realizamos a análise transcricional de genes de Las, em amostras de intestino de *D. citri* que se alimentou em citros infectados com Las, evidenciando a expressão da quase totalidade dos genes de Las, como forma de gerar conhecimento da fase inicial de infecção por Las no psílídeo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das amostras

A colônia estoque de *D. citri* livre de Las foi mantida em gaiolas em plantas de *Murraya paniculata* L. (Jack), conforme descrito por CARMO-SOUZA et al. (2020). Foram selecionados adultos com idade entre 7 e 10 dias para a etapa de aquisição de Las.

Mudas de laranja doce [*Citrus x sinensis* (L.) Osbeck], enxertadas em limoeiro cravo [(*Citrus x limonia* (L.) Osbeck)] foram mantidas em casa de vegetação em sacolas de 4 L e crescidas em substrato de casca de pinus decomposto (Plantmax citrus, Eucatex, Paulínia, SP, Brasil). A infecção por Las foi confirmada por qPCR (LI et al., 2006) e as plantas apresentavam sintomas de mosqueado. Plantas sadias nas mesmas condições de idade e cultivo foram utilizadas como controle negativo. O isolado de Las empregado neste trabalho tinha perfil de marcadores moleculares microsatélites e perfil de profagos idêntico ao apresentado pelo isolado Las 9PA (SILVA et al., 2019; 2021).

As plantas receberam uma poda drástica e foram mantidas em condições controladas com temperatura de $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, umidade relativa a 70%; e fotoperíodo de 14/10 h de claro/escuro. Os psílídeos adultos provenientes de colônias sadias foram confinados em gaiolas de voil cobrindo brotos no estágio vegetativo V2/V3 de plantas de laranja doce sadias e infectadas com Las (CIFUENTES-ARENAS et al., 2018). Antes do confinamento dos insetos, realizou-se uma amostragem dos brotos para a confirmação da presença da bactéria (LI et al., 2006).

A dissecação dos psílídeos para a amostragem dos intestinos ocorreu após diferentes períodos de acesso à aquisição: 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas, equivalentes a intervalos de 1 a 6 dias de aquisição. Os psílídeos foram retirados individualmente das plantas e dissecados em etanol 70% com dietil pirocarbonato (DEPC) 1 %, com auxílio de agulha sob microscópio estereoscópico. Foram realizadas três repetições para cada

um dos períodos de aquisição em plantas sadias ou infectadas, cada uma composta por 100 intestinos. Cada amostra foi processada em aproximadamente 2 horas. Durante a dissecação dos psíldeos, os intestinos eram imediatamente acondicionados em RNA Later (100 µL por amostra) (Invitrogen/ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

2.2 Extração do RNA total das amostras de intestino do psíldeo, detecção da presença de Las e tratamento com DNase

A extração do RNA total das amostras do intestino dissecados foi feita com o kit SV RNA Isolation System (Promega, Madison, USA). Amostras suspensas em 30 µL de água livre de nucleases foram avaliadas em relação à concentração do RNA total por espectrofotometria em NanoDrop V 3.8.1 (ThermoFisher Scientific).

A detecção de Las (LI et al., 2006) foi realizada previamente ao tratamento das amostras com DNase. Nas reações de qPCR, utilizou-se o Kit TaqMan qPCR Master Mix (Ambion/ThermoFisher Scientific), monitorando-se a presença do 16Sr DNA de Las com iniciador/sonda HLBspr (5'FAM/3'BHQ1, Macrogen, Seul, Coréia do Sul) e do gene *wingless* com iniciador/sonda DCP (5'HEX/3'BHQ1, Macrogen) para o DNA de *D. citri* (MANJUNATH et al., 2008). O threshold das sequências alvo foi ajustado manualmente no software StepOnePlus versão 2.3 (ThermoFisher Scientific). A qPCR foi realizada em duplicata e as amostras foram consideradas positivas para a presença de Las quando os valores de Ct foram iguais ou inferiores a 35.0 e negativas quando acima deste valor. A presença de DNA de *D. citri* produz valores de Ct iguais ou abaixo de 36.0. Amostras de DNA de psíldeo com e sem Las foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente.

As amostras de RNA total selecionadas foram tratadas com Turbo™ DNase (2 U/µl) (Ambion/ThermoFischer Scientific). A confirmação da ação da DNase em clivar o

DNA residual foi aferida pela qPCR com o gene *wingless* para *D. citri* (MANJUNATH et al., 2008).

2.3 Enriquecimento do mRNA das amostras e avaliação da qualidade

Nesta etapa as amostras foram agrupadas em: H = plantas sadias ou Las = plantas fonte de Las. H I e Las I = 1 e 2 dias de alimentação em citros; H II e Las II = 3 e 4 dias; H III e Las III = 5 e 6 dias. Cada período e fonte com três repetições biológicas. Em seguida, foram submetidas ao enriquecimento do mRNA com Ribo-Zero Gold rRNA Removal Kit (Illumina, Sand Diego, CA, USA). Dois microlitros foram utilizados para a quantificação em leitor de multidetecção Synergy (Biotec Synergy Winooski, EUA; software Gen5) para verificar a concentração e qualidade do mRNA. As amostras com concentrações totais de mRNA entre 80 e 200 ng foram utilizadas para o sequenciamento.

2.4 Sequenciamento do cDNA via plataforma Illumina

As amostras enriquecidas em mRNA foram submetidas ao protocolo de preparação da biblioteca de cDNA TruSeq RNA Library Prep Kit (Illumina) seguindo a estratégia *paired-end* (2 ×100 bp), que consiste na fragmentação do RNA enriquecido com mRNA em sequências de 200 nucleotídeos, seguida da ligação a iniciadores randômicos para a transcrição reversa e construção das bibliotecas de cDNA. O cDNA foi sintetizado e purificado pela utilização de esferas magnéticas e lavagens com etanol. Em seguida, as extremidades foram reparadas e adicionadas adenosinas nas extremidades 3' de cada fragmento. Na sequência foi realizada a ligação dos adaptadores e as amostras submetidas à amplificação via PCR. O sequenciamento de bibliotecas de cDNA foi realizado em plataforma Illumina HiScanSQ (Illumina), no Centro Multiusuário de Biotecnologia Agrícola do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP (Piracicaba, SP, Brasil).

2.5 Análise do sequenciamento e mapeamento das leituras no genoma de referência

As leituras obtidas no sequenciamento das bibliotecas de cDNA foram analisadas no programa FastQC (ANDREWS, 2010) para a verificação da qualidade. Adaptadores remanescentes foram removidos e as sequências trimadas seguindo o parâmetro SLIDINGWINDOW 4:22 para o início (LEADING:3) e final (LEADING:3) das leituras, que determinou o score de qualidade mínimo (22) para grupos de 4 nucleotídeos analisados no programa Trimmomatic 0.36 (BOLGER et al., 2014), onde também foram excluídas sequências inferiores a 25 nucleotídeos. Foram obtidas leituras das triplicatas dos 6 tratamentos, tempos I, II e III para adultos sadios e adultos infectados com Las, totalizando 18 bibliotecas.

O mapeamento das leituras presentes no intestino de ACP no genoma referência foi realizado através da contagem de *fragments per kilobase million* (FPKM) presentes em pelo menos duas de três das bibliotecas sequenciadas para cada um dos períodos de acesso à aquisição (Las I, Las II e Las III) e conversão do valor médio de FPKM das bibliotecas de cada período para $\log_2$ ($\log_2$ FPKM). A linhagem JXGC (NZ_CP019958; ZHENG et al., 2018) foi a referência para o mapeamento e contagem das leituras (reads) no genoma de Las e, conseqüentemente, determinação dos genes transcritos. Foram desconsideradas as sequências mapeadas aos RNA ribossomais, pseudogenes e tRNAs, esses últimos devido ao seu tamanho. Adicionalmente, para a análise dos profagos SC1 e SC2 foi utilizada a sequência da linhagem Las UF506 (HQ377374.1; ZHANG et al., 2011), assim como o profago do tipo 3 (PJXGC-3) de Las JXGC (KY661963; ZHENG et al., 2018). Estas análises empregaram os seguintes parâmetros: “mismatches cost”: 2; “insertion cost”: 3; “deletion cost”: 3; “length fraction”: 0,8; “similarity fraction”: 0,8; “strand specific”: “both”; “maximum number of hits for a read”: 2, realizadas no programa CLC Genomics v. 12.0 (Qiagen, Hilden, Germany).

A anotação funcional das leituras (Agrupamento de grupos ortólogos de proteínas (Cluster of Orthologous Groups of proteins – COG's)), gerados pelo mapeamento nos genes de Las foi realizada de acordo com TATUSOV et al., (2000). Foram utilizados 3 genomas de referência, duas α -proteobactérias: *Candidatus Liberibacter solanacearum* (isolado CLso-ZC1), *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (isolado 3841) e *Escherichia coli* (O157:H7 strain Sakai). A montagem dos gráficos foi realizada utilizando o GraphPad Prism versão 8.0.0 (Windows GraphPad Software, San Diego, CA, USA), e o diagrama de Venn foi montado utilizando-se o 'Draw Venn Diagram' (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) como ferramenta.

3 RESULTADOS

3.1 Presença de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em amostras de intestino do psilídeo *Diaphorina citri*

A análise dos brotos de citros através de qPCR confirmou a presença de Las (Ct 20,71) somente nas plantas infectadas. Em todas as amostras de RNA dos intestinos foi detectada a presença de DNA do psilídeo (Tabela 1).

O valor médio da qPCR para o gene *wingless* de *D. citri* foi de 30.7 (Tabela 1), corroborando a necessidade de tratamento com DNase antes da síntese de cDNA. A presença de DNA permitiu, porém, monitorar a presença de DNA de Las, como forma de validar a presença da bactéria nos intestinos dissecados de *D. citri*, previamente à realização do transcriptoma. Detectou-se a presença de Las através de qPCR somente em amostra de RNA vindos de intestinos cujos insetos alimentaram-se em brotos de plantas infectadas com Las (Tabela 1): nas bibliotecas Las I e Las II o valor médio de Ct para o gene 16Sr DNA de Las foi de 30.6 e 30.8, respectivamente, enquanto para as bibliotecas de Las III o valor de Ct foi de 27.3. Para as amostras de intestino de psilídeos confinados em plantas sadias (bibliotecas H I, II e III) não houve detecção de DNA de Las.

Tabela 1. Concentração de RNA (ng/μL) e qualidade (260/280) mensuradas espectrofotometricamente e detecção de *Diaphorina citri* (DC) e *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) (HLBaspr) por qPCR em amostras de RNA preparadas a partir de intestinos de *D. citri*, antes do tratamento com DNase e sequenciamento das bibliotecas. Amostras de intestinos dissecados de *D. citri* criados em plantas de citros sadias (H) ou Las em diferentes períodos acessos de aquisição (PAA) (Las I, II e III).

PAA	Amostra	RNA		qPCR Ct ^a	
		ng/μL	260/280	DC ^b	HLBaspr ^c
I = 1/2 dias	H I_1	59,06	2,06	31,11±0,77	nd
	H I_2	68,86	2,16	29,91±0,20	nd
	H I_3	46,59	2,07	30,44±0,79	nd
	Las I_1	56,20	2,03	30,25±0,15	32,18±2,72
	Las I_2	56,85	2,10	30,77±0,43	30,68±0,54
	Las I_3	65,10	2,05	29,20±0,12	28,99±0,87
II = 3/4 dias	H II_1	69,69	2,12	31,91±1,27	nd
	H II_2	58,69	2,12	29,39±1,87	nd
	H II_3	57,89	2,13	29,46±1,20	nd
	Las II_1	74,56	2,04	30,52±1,49	29,69±1,53
	Las II_2	48,18	2,08	31,17±0,21	32,24±2,08
	Las II_3	65,88	2,13	33,71±0,04	30,45±0,68
III = 5/6 dias	H III_1	68,21	2,01	30,09±0,16	nd
	H III_2	58,44	2,07	30,90±0,11	nd
	H III_3	46,42	2,07	32,50±1,71	nd
	Las III_1	51,26	2,14	28,96±0,85	26,18±2,10
	Las III_2	45,92	2,02	30,10±0,80	26,48±0,02
	Las III_3	51,08	2,04	31,86±0,77	29,40±0,69

^a Ct = Cycle threshold, média da duplicata ± EP; nd = não detectado

^b DC = qPCR para a detecção do gene *wingless* de *D. citri* (MANJUNATH et al., 2008)

^c HLBaspr = qPCR para a detecção da região 16SrDNA de *Ca. L. asiaticus* (LI et al., 2006)

(Fonte: o autor)

3.2 Mapeamento das leituras de *Candidatus Liberibacter asiaticus*

A porcentagem média de leituras de *Ca. L. asiaticus* mapeados em amostras sadias (HI, II e III) foi de 0,01, 0,00 e 0,02, respectivamente (Tabela 2). Enquanto que nas bibliotecas provenientes de intestinos de psílídeos que se alimentaram em plantas infectadas com Las (Las I, II e III) foi de 0,07, 0,16 e 0,53, respectivamente (Tabela 2).

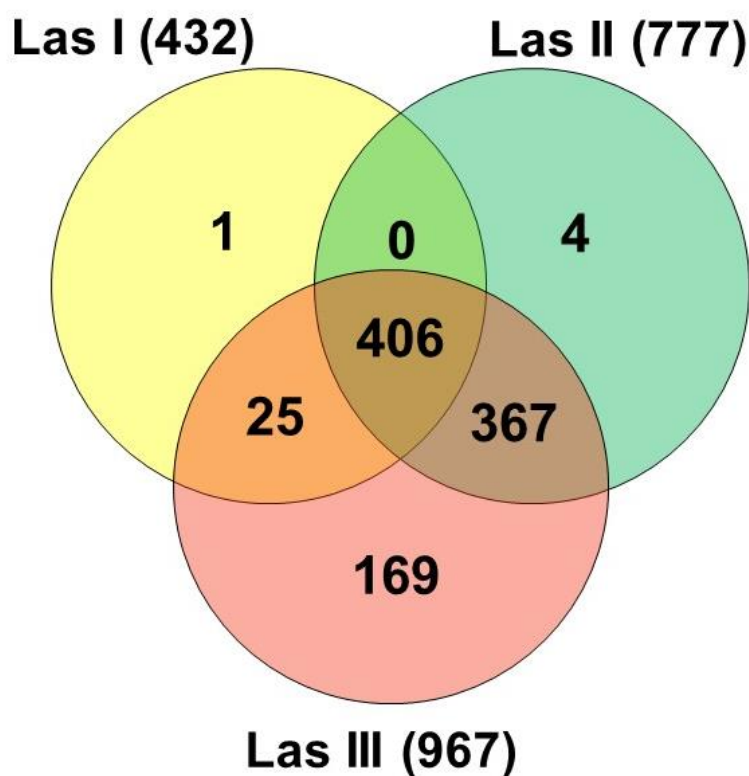
Tabela 2. Mapeamento de leituras de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) contra o isolado JXGC (NZ_CP019958.1) em bibliotecas sequenciadas a partir de amostras intestinais de *Diaphorina citri* que se alimentaram em brotos de citros sadios (H) ou Las positivos, em diferentes períodos de acesso a aquisição (PAA) (Las I, II e III).

PAA	Biblioteca	Total de leituras	Leituras mapeadas em pares (%)
I = 1/2 dias	H I_1	14,662,250	0.00
	H I_2	17,002,637	0,01
	H I_3	16,119,271	0,01
	Média	15,928,053	0,01
	Las I_1	16,809,192	0,06
	Las I_2	16,066,925	0,19
	Las I_3	14,342,296	0,09
	Média	15,739,471	0,07
II = 3/4 dias	H II_1	15,288,196	0,00
	H II_2	17,110,015	0,01
	H II_3	17,831,678	0,00
	Média	16,743,296	0,00
	Las II_1	15,083,210	0,09
	Las II_2	16,125,467	0,03
	Las II_3	14,389,488	0,36
	Média	15,199,388	0,16
III = 5/6 dias	H III_1	16,064,435	0,01
	H III_2	15,614,261	0,04
	H III_3	15,142,440	0,01
	Média	15,607,045	0,02
	Las III_1	17,908,705	0,40
	Las III_2	16,163,569	0,86
	Las III_3	16,311,141	0,33
	Média	16,794,472	0,53

(Fonte: o autor)

No mapeamento de leituras contra o genoma de Las, as leituras contadas representaram atividade de transcrição, medida pelo valor de FPKM. Obteve-se para Las I cobertura de 432 genes, enquanto nas bibliotecas Las II e Las III foram mapeados 777 e 967 genes, respectivamente (Figura 1). Dos genes preditos no isolado de Las JXGC (ZHENG et al., 2018), 972 tiveram leituras mapeadas em pelo menos um dos três períodos de acesso à aquisição (Las I, II ou III) em intestino de psílídeos que se alimentaram em brotos de plantas infectadas com Las. O transcriptoma de todas as bibliotecas nos três períodos avaliados, corresponde ao mapeamento de 95 % dos genes preditos em Las. Deste total, 406, ou 41,8% dos genes, foram compartilhados entre as bibliotecas de todos os períodos de aquisição, enquanto 367 genes tiveram leituras nas bibliotecas Las II e Las III. Na biblioteca Las I, houve um gene de expressão exclusiva (B2I23_RS05235; uma proteína de função desconhecida, com domínio DUF1376), enquanto quatro foram exclusivos da biblioteca Las II (B2I23_RS00005, uma helicase do profago; B2I23_RS00270; B2I23_RS02880 e B2I23_RS05570, três proteínas hipotéticas); e 169 presentes apenas na biblioteca Las III. Ausência de expressão (sem leituras) foi observada para 51 genes preditos no isolado JXGC.

Figura 1. Diagrama de Venn dos genes de *Candidatus Liberibacter asiaticus* com leituras mapeadas (isolado JXGC, NZ_CP019958.1) em amostras de intestinos de *Diaphorina citri* após 1/2 (Las I), 3/4 (Las II), ou 5/6 (Las III) dias de acesso à aquisição.



(Fonte: o autor)

Na análise da abundância de leituras para cada biblioteca e sua distribuição ao longo do genoma de referência JXGC, obteve-se para Las I uma cobertura média de 42% dos genes preditos no genoma (Figura 2). sendo a porcentagem média de cobertura nas bibliotecas Las II e Las III 76% e 94,5%, respectivamente (Figura 2). Enquanto o número de genes com leituras mapeadas aumenta consideravelmente com o passar do tempo que o psilídeo alimenta-se na planta com Las (Las I, Las II e Las III), o valor médio de $\log_2(\text{FPKM})$ tem pequena redução, passando de 9,4 em Las I para 8,8 e 8,4 em Las II e Las III, respectivamente (Figura 2). Somente na biblioteca Las III há maior número de genes mapeados com valores acima da média.

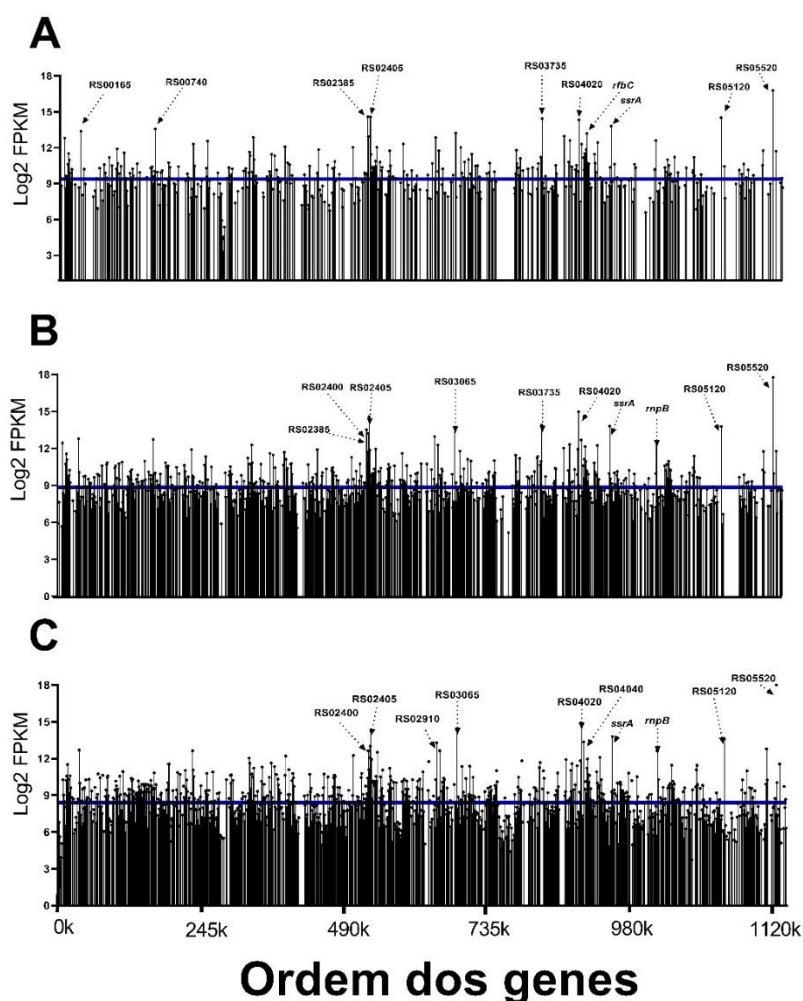
Entre os dez genes com maior número de mapeamento de leituras do transcriptoma em cada período, quatro são anotados com função hipotética/não caracterizada: B2I23_RS05520; B2I23_RS05120, B2I23_RS04020 presentes nas bibliotecas Las I, II e III, enquanto B2I23_RS05445, somente em Las III (Figura 2).

A transcrição dos genes B2I23_RS02385, B2I23_RS02405, B2I23_RS02400, anotados como "Família Flp de pilina do tipo IVb" foi marcante nas bibliotecas Las I, II e III. Leituras para B2I23_RS03065, cuja anotação é para uma proteína de membrana ("proteína da família porina"), também foi expressiva.

Leituras para o gene B2I23_RS03735 ("NADH-quinona oxidoreductase subunidade C") estavam presentes entre os 10 genes com maior representatividade nas bibliotecas Las I e Las II. Uma ATP-dependente Clp protease ATP- subunidade de ligação – *clpX* (B2I23_RS00740) foi mapeada em Las I, enquanto em Las II teve alto valor de $\log_2(\text{FPKM})$, mas não esteve entre as dez mais expressas (Figure 2). B2I23_RS04070 (*rfbC*) codifica uma dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase envolvida na síntese de polissacarídeos contendo ramnose, como nos lipopolissacarídeos, é altamente expressa em Las I.

As demais leituras com maior representatividade estão envolvidas no metabolismo de ribossomos, como o mensageiro de transferência de RNA – *ssrA* (B2I23_RS00765), RNase P – *rnpB* (B2I23_RS04605) e nos genes das proteínas ribossomais *rpmJ* (B2I23_RS00165) e *rpsT* (B2I23_RS02910). O gene do “Domínio de uma proteína de choque térmico” (B2I23_RS04040) que funciona como chaperona, está entre as mais expressas de Las III.

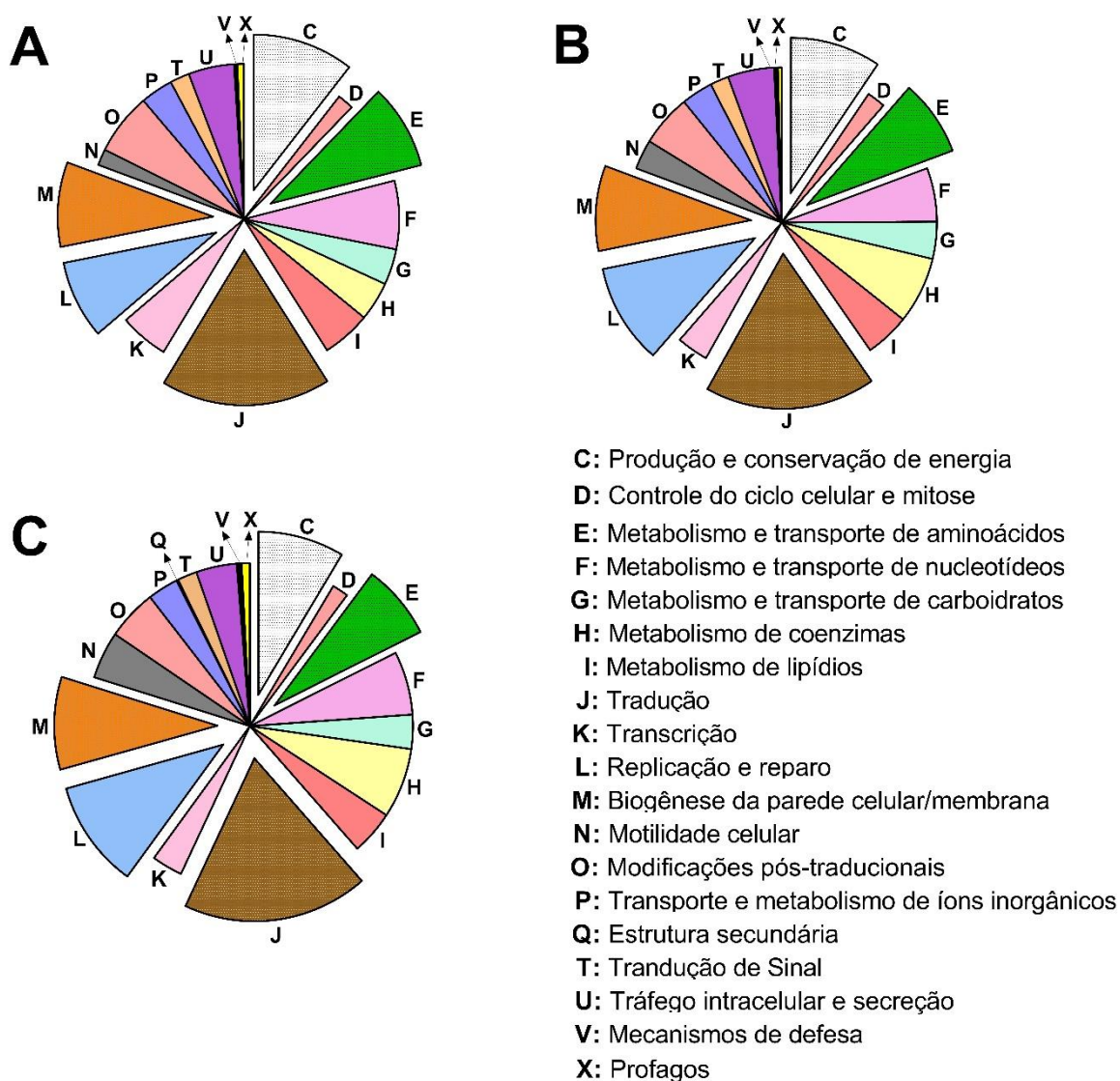
Figura 2. Abundância de leituras mapeadas para genes de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (isolado JXGC, NZ_CP019958.1) expressos em amostras de intestinos de *Diaphorina citri* após 1/2 (Las I) (A), 3/4 (Las II) (B), ou 5/6 (Las III) (C) dias de acesso à aquisição.



(Fonte: o autor)

A classificação dos transcritos mapeados pelo agrupamento de grupos de proteínas ortólogos (COGs) (TATUSOV et al., 2000), identificou maior expressão nos COGs tradução (J), replicação e reparo (L), biogênese da parede celular/membrana (M), produção e conservação de energia (C) e metabolismo e transporte de aminoácidos (E) (Figura 3).

Figura 3. Distribuição dos agrupamentos de grupos ortólogos em *Candidatus Liberibacter asiaticus* (isolado JXGC, NZ_CP019958.1) em amostras de intestinos de *Diaphorina citri* após 1/2 (Las I) (A), 3/4 (Las II) (B), ou 5/6 (Las III) (C) dias de acesso a aquisição.

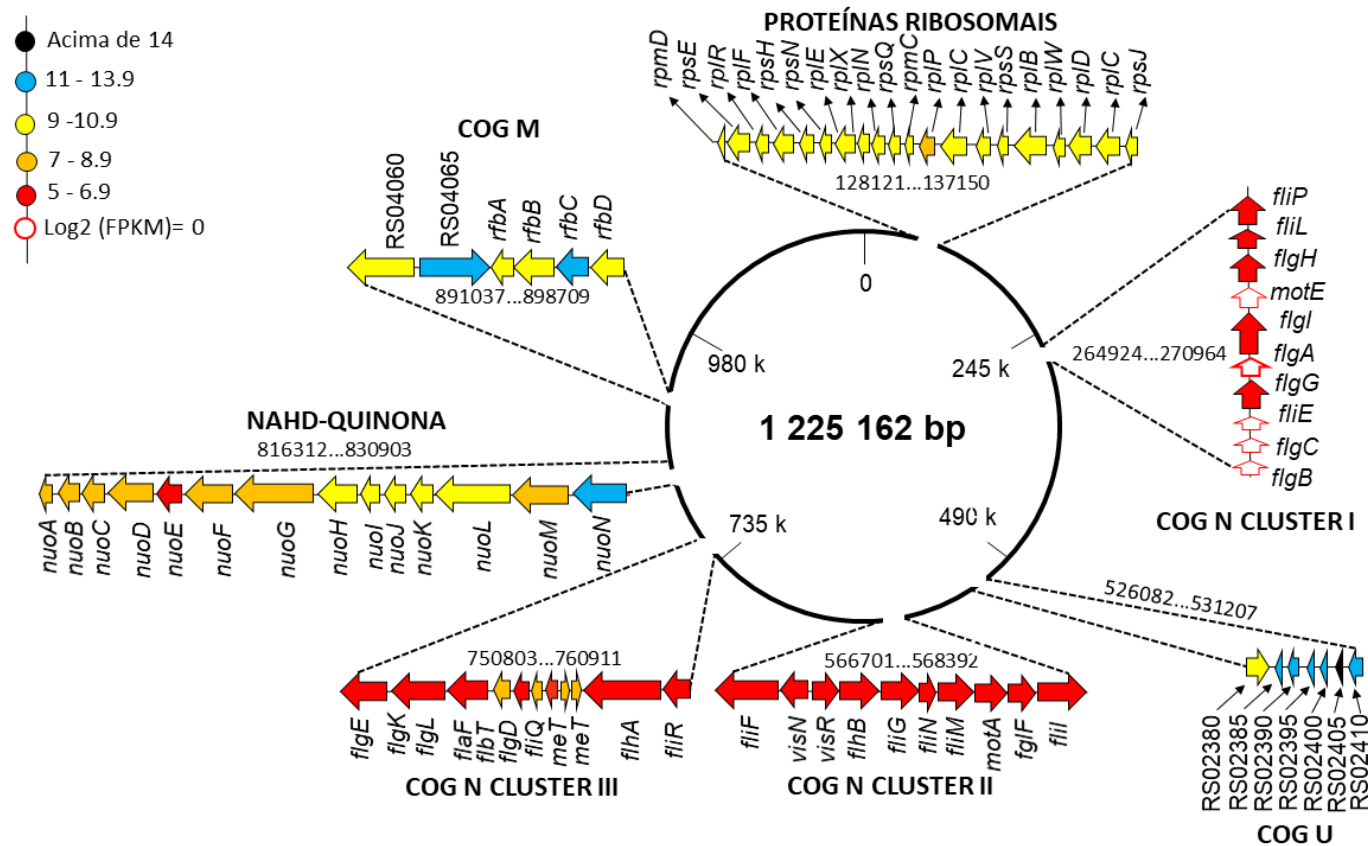


(Fonte: o autor)

Nas bibliotecas Las III a média do $\log_2(\text{FPKM})$ foi de 8,4 (Figura 2 e 4), e nesta biblioteca, a cobertura de sequenciamento foi maior em relação as bibliotecas Las I e Las II (Figuras 1 e 2). Quando analisadas exclusivamente as bibliotecas Las III em função da maior cobertura como parâmetro de seleção, destacam-se os Cluster I, II e III que codificam proteínas flagelares (COG N), com valores médios de $\log_2(\text{FPKM})$ em 5,5, 6,3 e 6,5; respectivamente. Os genes *motE*, *flgA*, *fliE*, *flgB* e *flgC* não foram mapeados. (Figura 4, COG N I, II e III). As sequências preditas para "Família Flp do tipo IVb de pilina" (Figura 4; COG: U) apresentaram valores médios de $\log_2(\text{FPKM})$ de 12,2, acima da média em Las III. A região com proteínas envolvidas na síntese de lipopolissacarídeos apresentou valores médios de $\log_2(\text{FPKM})$ 10,6, também acima da média em Las III (Figura 4, COG: M). Uma região que engloba 20 das 54 proteínas ribossomais anotadas no genoma de Las, compreendida entre a região 128k e 137k (Figura 4A) e outra, onde estão anotadas 13 subunidades de NADH-quinona oxidoreductases, compreendidas entre a região 816kbp e 830kbp (Figura 4), apresentaram valores de $\log_2(\text{FPKM})$ médio de 9,1 e 8,8; respectivamente.

As duas formas curtas da subunidade β - ribonucleotídeo redutase (RNR) de Las, B2I23_RS00035 e B2I23_RS04515, não tiveram leituras mapeadas [$\log_2(\text{FPKM})=0$], assim como 35 genes que codificam proteína hipotéticas, um gene com domínio VRR-NUC (B2I23_RS05600), dois genes com domínio DUF59 (B2I23_RS01860 e B2I23_RS03885), um gene com domínio DUF2815 (B2I23_RS05410), uma ATPase (B2I23_RS02840), uma nuclease (B2I23_RS05420) e uma primase (B2I23_RS05400) não foram mapeados.

Figura 4. Nível de expressão de genes ao longo do cromossomo de *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Agrupamentos flagelares (COG N: I, II e III), “Família Flp do tipo IVb de pilina” (COG U), transferases (COG M), proteínas ribossomais e NADH-quinonas são individualmente mostrados em sua posição no cromossomo. Abundância de leitura (log2FPKM) obtidas de bibliotecas de intestinos de *Diaphorina citri* 5/6 dias após acesso à aquisição e mapeadas na linhagem JXGC (NZ_CP019958.1).



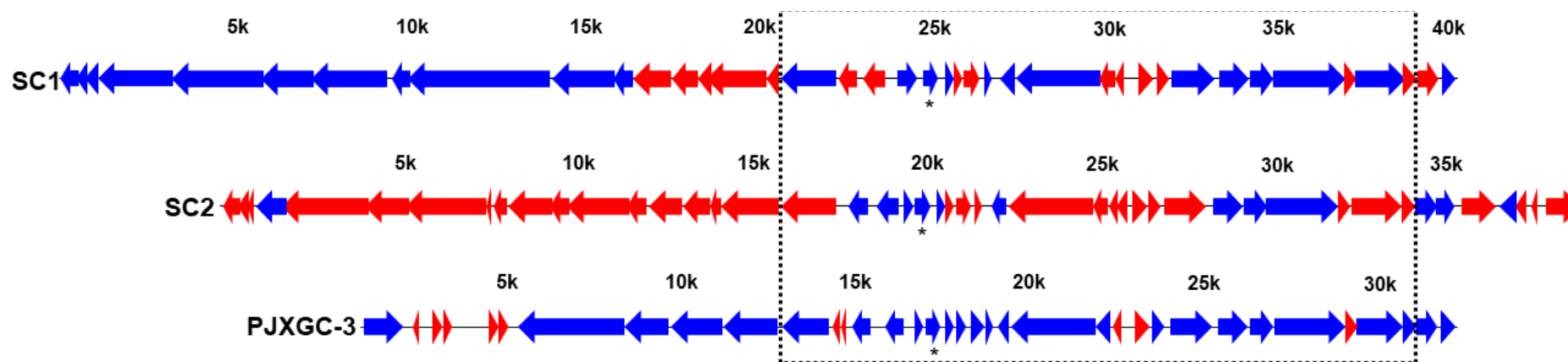
(Fonte: o autor)

3.3 Mapeamento dos profagos SC1, SC2 e PJXGC-3 de Las no intestino de ACP

Leituras de Las foram mapeadas nos genomas dos profagos SC1 (UF506) e tipo 3 (PJXGC-3) (Figura 5). Na região altamente conservada e compartilhada entre ambos os profagos, conhecida como região de genes precoces (ou '*early genes*') e também compartilhada com SC2, a alta similaridade entre as sequências dos genes nos profagos não permite diferenciação quanto a presença de leituras entre os profagos, exceto em regiões divergentes. Não houveram leituras mapeadas nos genes em comum: SC1_gp175/PJXGC_gp25 e SC1_gp185/PJXGC_gp26, ambas codificando proteínas hipotéticas e em SC1_gp215/PJXGC_gp32, uma endonuclease (VVR-NUC). Os demais genes tiveram leituras mapeadas. O gene para a proteína hipotética PJXGC_gp17 (B2I23_RS05520) /SC1_gp135 (F488_gp21) (Figuras 2 e 5) é o que tem a maior representatividade de cobertura de leituras em todas as bibliotecas.

Nas regiões dos genes tardios (ou '*late genes*'), observou-se cobertura de leituras em 65% nos genes de SC1 e 54% em PJXGC-3 (Figura 5). No profago SC1, os seguintes genes tiveram leituras mapeadas (genes que não tem indicação codificam para proteína hipotéticas): SC1_gp005, SC1_gp010; SC1_gp015, SC1_gp025 (proteína da fibra da cauda), SC1_gp030, SC1_gp035 (endolisina), SC1_gp045, SC1_gp050, SC1_gp060 (colicina IA), SC1_gp080 e SC1_gp085 (subunidade principal da cauda). Os demais genes não foram mapeados: SC1_gp010, SC1_gp090 (proteína principal do capsídeo), SC1_gp095, SC1_gp100, SC1_gp105 (proteína de união cabeça a cauda) e SC1_gp110 (holina). Em PJXGC, os genes PJXGC_gp01, PJXGC_gp02, PJXGC_gp07 a PJXGC_gp10, que codificam as subunidades R e S do sítio específico do tipo I de desoxirribonuclease (HsdR) e duas subunidades da DNA metiltransferase dependente de SAM, respectivamente, foram mapeadas, enquanto nas demais não houve mapeamento de leituras.

Figura 5. Leituras mapeadas nos profagos SC1 (tipo 1), SC2 (tipo 2) do isolado Las UF506 (HQ377374) e PJXGC-3 (tipo 3) do isolado Las JXGC (KY661963). Setas azuis indicam genes mapeados em pelo menos duas bibliotecas. Setas vermelhas indicam genes sem leituras mapeadas. Asteriscos indicam o gene com maior número de leituras mapeadas. O quadro de linhas pontilhadas (preto) indica a região altamente conservada de genes tardios entre os profagos de Las. O nível de expressão foi obtido de bibliotecas de intestinos de *Diaphorina citri* após 5/6 dias (Las III) de alimentação em laranjeiras doce infectadas com Las.



(Fonte: o autor)

4 DISCUSSÃO

A aquisição de Las por *Diaphorina citri* ocorre durante a alimentação em plantas infectadas com Las (HUNG et al., 2004, INOUE et al., 2009, PELZ-STELINSKI et al., 2010), com ausência (HUNG et al., 2004) ou muito baixa (PELZ-STELINSKI et al., 2010) transmissão transovariana. A obtenção de amostras do intestino de *D. citri* contendo Las requer a manipulação dos indivíduos para dissecação, manutenção da integridade do órgão, com quantidade e qualidade suficiente de mRNA, particularmente de Las, para revelar o conjunto de genes expressos no processo de colonização do intestino do psíldeo. Psíldeos que se alimentam em brotos de plantas de citros afetadas com Las, sob condições ambientais adequadas, tais como as empregadas neste trabalho, geram alta porcentagem de psíldeos com Las e capazes de transmitir a bactéria para novas plantas (Lopes SA, Fundecitrus, comunicação pessoal).

Os psíldeos que tiveram acesso à alimentação em brotos com Las por cinco a seis dias tiveram cerca de dez vezes mais Las nos intestinos do que nos períodos anteriores, de até quatro dias. Com esta metodologia foi possível gerar informações sobre o transcriptoma de Las no lúmen e na colonização do intestino de *D. citri*. Além de maiores valores de qPCR para a presença de Las serem observados nos maiores tempos de aquisição de Las pelo psíldeo, maiores foram as quantidades de leituras de Las mapeados nestas bibliotecas (Las III > Las II > Las I). No maior tempo de alimentação em plantas infectadas com Las, de 5 a 6 dias (Las III), 0,53% das leituras foram mapeados no genoma de Las. Foram mapeados 0,5% das leituras de Lso obtidos em sequenciamento de cDNA em biblioteca do corpo do psíldeo *B. cockerelly* (IBANEZ et al., 2014). No mapeamento de leituras do fitoplasma da flavescence dorée na videira, somente

0,01% das leituras mapearam no genoma do fitoplasma (ABBÀ et al., 2014). Em Las a razão DNA bacteriano em relação ao hospedeiro é maior em psílídeos do que em planta (SELVARAJ et al., 2018), o que além de favorecer a obtenção de DNA genômico bacteriano para sequenciamento (DUAN et al., 2009; ZHENG et al., 2018), permite a obtenção de amostras de mRNA bacteriano para estudos de expressão gênica como aqui demonstrado e como realizado com Lso em *B. cockerelly* (IBANEZ et al., 2014).

A escolha em obter um transcriptoma a partir de bibliotecas de cDNA de amostras de intestinos se deve ao fato do intestino ser a primeira barreira celular encontrada pela bactéria para a infecção sistêmica do corpo do psílídeo (AMMAR et al., 2011a) e onde o título de Las é elevado (AMMAR et al., 2011a, b; GHANIM et al., 2017), muito embora a maioria dos órgãos de *D. citri* sejam infectados por Las (AMMAR et al., 2011a, b). A eficiência da transmissão de *Liberibacter* por psílídeos está, provavelmente, associada à capacidade da bactéria em multiplicar nos tecidos do corpo do inseto, além da capacidade de cruzar as barreiras internas do ACP durante o processo de aquisição e multiplicação de Las, especialmente no intestino, hemolinfa e nas glândulas salivares (AMMAR et al., 2011a, b; CÍCERO et al., 2015; AMMAR et al., 2016; GHANIM et al., 2017). Portanto, nossa hipótese é que alterações transcricionais importantes em Las ocorram no intestino de *D. citri*, em função do processo inicial de colonização do inseto.

Leituras mapeadas no genoma de Las a partir de bibliotecas de amostras de intestinos de ACP sadias (H I, II e III), têm além das sequências do psílídeo, sequências de regiões similares a outras bactérias endossimbiontes presentes no intestino do ACP, como as regiões conservadas dos genes ribossomais

bacterianos. Em *D. citri* foi relatada a presença dos endossimbiontes primários, ‘*Ca. Carsonella ruddi*’ e ‘*Ca. Profftella armatura*’ (NAKABACHI et al., 2013), além de *Wolbachia* spp., que coloniza as mesmas células do intestino de *D. citri*, mas não o mesmo sítio no interior da célula (KRUSE et al., 2017). O gene *lysE* de Las (B2I23_RS04390), que codifica uma proteína envolvida no metabolismo e transporte de aminoácidos, foi possivelmente adquirido de ‘*Ca. P. armatura*’ por transferência gênica horizontal (NAKABACHI et al., 2013), indicando a troca de material genético e a similaridade em determinados trechos do genoma entre bactérias residentes nos psílídeos. Estas três bactérias são encontradas nas populações de *D. citri* no Brasil (DOSSI et al., 2014), assim como a incidência de Las em indivíduos de *D. citri* é elevada no Brasil (WULFF et al., 2020). Os dois endossimbiontes e *Wolbachia* spp. foram encontradas no transcriptoma de *B. cockerelli*, vetor de Lso (IBANEZ et al., 2014).

A depleção do RNA ribossomal com consequente enriquecimento do mRNA, possibilitou a obtenção de um número representativo de mapeamento (0,53%) com cobertura de 95% do genoma de Las. Observaram-se leituras dessas regiões ribossomais presentes no sequenciamento das bibliotecas de Las (dados não mostrados), assim como observado no RNA-Seq de ‘*Ca. L. solanacearum*’ (IBANEZ et al., 2014), mas a depleção destas moléculas é essencial para estudos de transcriptômica de bactérias associadas a eucariotos (KUMAR et al., 2015).

As espécies patogênicas de ‘*Candidatus Liberibacter* spp.’ infectam uma ampla gama de hospedeiros importantes economicamente (GARNIER et al., 1984; TEIXEIRA et al., 2008; BOVÉ et al., 2006; LIEFTING et al., 2008; MUNYANEZA et al., 2009; THAPA et al., 2020) e compartilham características

específicas que tornam seu estudo laborioso: são bem adaptadas aos psilídeos vetores e estão limitadas ao floema de seus hospedeiros vegetais. Na maioria das bactérias com genomas reduzidos, há menor número de genes envolvidos no metabolismo de compostos prontamente disponíveis pelo hospedeiro, assim como fatores sigma, provavelmente refletindo o desafio de um ambiente específico e associado com o estilo de vida intracelular (KONSTANTINIDIS & TIEDJE, 2004). Além disso, Las tem o genoma reduzido em relação a bactérias de vida livre, evidenciando uma possível correlação entre o processo evolutivo e a pressão de adaptação, com consequente perda/deleção de sequências não funcionais ou redundantes (MIRA et al., 2001; SÄLLSTRÄM & ANDERSSON, 2005), fatores estes que tornam ‘*Ca. Liberibacter* spp.’ patogênicas altamente dependentes de seus hospedeiros. Por esses motivos, até o momento não foi possível o isolamento e o cultivo axênico, tendo como exceção *Liberibacter crescens* (LEONARD et al., 2012), uma espécie não-patogênica de *Liberibacter*. O cultivo axênico de *L. crescens* permitiu seu uso em estudos de expressão heteróloga, genômica comparativa e o desenvolvimento de ensaios *in vitro* (JAIN et al., 2015; CRUZ-MUNHOZ et al., 2019). Sabe-se que no genoma de Las e outras liberibactérias com genomas sequenciados não estão presentes diversas vias biossintéticas completas, como o sistema de secreção tipo II (SSTII), sistemas avr e hrp, genes para enzimas envolvidas na degradação de parede celular de plantas, como celulasas, pectinases, xilanases e endoglucanases (DUAN et al., 2009; LIN et al., 2011; WULFF et al., 2014; LIN et al., 2015). Potenciais efetores de Las (THAPA et al., 2020) não tiveram alterações expressivas durante a colonização do intestino do ACP e foram majoritariamente expressos, exceto CLIBASIA_04530.

O processo ativo de invasão e de colonização do hospedeiro pelo patógeno, bem como sua multiplicação, é exigente em proteínas que modulam o processo de replicação e produção de energia. Observou-se alta cobertura de leituras em genes correspondentes às proteínas ribossomais, nas subunidades de NADH-quinona oxidoreductases, que são responsáveis pela produção de energia para os processos celulares, genes para a biossíntese de lipopolissacarídeos, indicando atividade metabólica de Las no processo de infecção do intestino do *D. citri*. B2I23_RS03735 codifica a subunidade C da NADH-quinona oxidoreductase (*nuoC*), parte das subunidades *nuoA* a *nuoN*, que compreendem a subunidade mínima do complexo funcional enzimático I (SPERO et al., 2015). Enquanto este gene foi mapeado entre os dez mais expressos em Las I e Las II, todos os 14 genes que codificam as subunidades do complexo foram expressos em Las II e Las III. Na maioria das clades bacterianas, a expressão de *nuoA* a *nuoN* é provavelmente na forma de um operon policistrônico (SPERO et al., 2015). YAN et al. (2013) avaliou somente *nuoA* e esse gene foi mais expresso em psílídeos do que em citros. Juntos, estes resultados indicam que os genes do complexo I são expressos por Las durante a colonização do intestino do psílídeo e desempenham a função de reoxidar NADH, mantendo o status redox da célula (SPERO et al., 2015), ao mesmo tempo que indica a ação metabólica de Las para geração de energia.

Todos os genes que codificam componentes da família da protease Clp foram expressos em Las III: *clpA* (B2I23_RS00185), *clpS* (B2I23_RS00190), endopeptidase La (B2I23_RS00735), *clpP* (B2I23_RS00745), *hslU* (B2I23_RS01895), *hslV* (B2I23_RS01900), lon peptidase (B2I23_RS02370) e *clpB* (B2I23_RS03845), além de *clpX* (B2I23_RS00740). O complexo protease

Clp degrada proteínas que não foram corretamente empacotadas, fatores de transcrição, proteínas de fagos, além de envolvimento em outros processos regulatórios (PORANKIEWICZ et al., 1999). B2I23_RS04070 codifica uma dTDP-4-desidrorhamnose 3,5-epimerase (*rfbC*), a qual juntamente com *rfbABD* (GRANINGER et al., 1999), está envolvida na síntese de polissacarídeos contendo ramnose, tais como encontrado em *Rhizobium* spp. (GHOSH & MAITI et al., 2016). Os quatro genes foram altamente expressos em todas as bibliotecas (B2I23_RS04070 a B2I23_RS04085), assim como os demais genes envolvidos na síntese de lipopolissacarídeos foram gradualmente mapeados entre Las I e Las II, sendo todos expressos em Las III.

Também foram altamente expressos genes cujos produtos estão envolvidos na resposta de estresse a choque térmico (B2I23_RS04040) e uma família de proteínas de choque térmico Hsp20 (B2I23_RS02935), que funcionam como chaperonas. O transcriptoma de Las no intestino do ACP, assim como o de Lso em *B. cockerelli*, também evidenciou a alta expressão do gene de uma proteína de choque térmico (CKC_03300), que têm sido correlacionadas à possíveis mecanismos de patogenicidade e adaptação bacteriana a novos ambientes (IBANEZ et al., 2014; MOHAMED et al., 2020).

Dois genes que codificam pili do tipo IV foram mapeados durante a colonização do ACP nos períodos de acesso à aquisição avaliados, Las I, Las II e Las III (B2I23_RS02385 e B2I23_RS02400). Pili do tipo IV é um fator de virulência (WAIRURI et al., 2012) e as pilinas exercem importante função na interação com superfícies, principalmente na adesão superficial, podendo estar envolvido na formação de biofilme, inclusive em *L. crescens* (NARANJO et al., 2019). Lso forma biofilme no processo de infecção no intestino de *B. cockerelli*

(CICERO et al., 2016), enquanto *L. crescens* forma biofilme *in vitro*, muito embora a taxa de formação corrobore a ausência de motilidade por contração, ou '*twitching motility*' (NARANJO et al., 2019).

Mesmo com genoma reduzido, Las apresenta três clusters flagelares (ANDRADE et al., 2019). O cluster I com expressão parcial e os cluster II e III com ampla expressão na biblioteca Las III. Porém, até o presente momento não foi comprovada a presença de apêndices flagelares em Las (ANDRADE et al., 2019), condizente com a não expressão de *motE*, *flgA*, *fliE*, *flgB* e *flgC* e sua importância em Las permaneça uma questão em aberto. Entretanto, há a presença de estruturas flagelares em *L. crescens* (ANDRADE et al., 2019) e evidências de apêndices superficiais em Lso (CICERO et al., 2016). ANDRADE et al. (2019) demonstraram que a expressão de genes flagelares é maior no psílideo do que na planta, em contraste ao observado anteriormente (YAN et al., 2013), ambos empregando RT-qPCR. A transcriptômica mostrou-se útil na avaliação da ampla gama de genes envolvidos em mesmo processo biológico.

Entre os genes mapeados e com maior representatividade, três são sequências anotadas como proteínas hipotéticas (B2I23_RS05520, RS04020 e RS05445). No primeiro sequenciamento completo de Las, linhagem psy62, 26% das proteínas foram anotadas como hipotéticas, enquanto 74% das sequências codificantes possuíam homólogos com funções preditas (DUAN et al., 2009). No sequenciamento da linhagem Las JXGC, o número de genes anotadas como proteínas hipotéticas foi reduzido a 14% (ZHENG et al., 2018), sendo que 72% desse percentual se concentram entre as regiões 687kbp e 1219kbp, região esta que engloba as três proteínas acima mencionadas e o profago PJXGC-3, onde a maioria genes permanecem com essa anotação (64%). A presença e

abundância de leituras em genes dessas proteínas hipotéticas dos profagos evidencia a necessidade de estudos funcionais com esses genes e seus produtos.

A linhagem chinesa de Las JXGC (ZHENG et al., 2018) foi utilizada como referência para o mapeamento das leituras de Las presentes na colonização do intestino do ACP, devido à similaridade na região dos profagos de JGXC com as linhagens predominantes no Brasil (SILVA et al., 2021). Efetivamente, as diferenças entre as linhagens de Las residem nos profagos (DUAN et al., 2009; ZHANG et al., 2011; KATOH et al., 2014; ZHENG et al., 2018), enquanto a identidade nucleotídica média no genoma entre isolados de Las varia entre 99-100% (THAPA et al., 2020). A partir da descrição e anotação dos três tipos de profagos no genoma de Las (ZHANG et al., 2011; ZHENG et al., 2018), estudos têm relacionado a presença dos mesmos à uma possível vantagem adaptativa de sua presença em Las e outras Liberibactérias durante a colonização do hospedeiro, bem como sua relação com a diversidade bacteriana (TOMIMURA et al., 2009, WULFF et al., 2014, JAIN et al., 2017b). A presença ou ausência de profagos responde por ampla parcela da variação entre indivíduos em uma dada espécie (CASJEANS et al., 2003). É pequena a proporção de linhagens de Las que não apresentam profagos (SILVA et al., 2019; ZHENG et al., 2018; ZHENG et al., 2021). Quando analisado o mapeamento das regiões dos profagos SC1, SC2 e PJXGC-3 no transcriptoma de Las no intestino de *D. citri*, observou-se maior cobertura/presença de leituras nos profagos SC1 e PJXGC-3 em relação ao profago SC2. SC2 carrega vários genes que possivelmente estão envolvidos na conversão lisogênica de Las (ZHANG et al., 2011), bem como na supressão da defesa de plantas, incluindo duas peroxidases (SC2_gp095 e gp100) (JAIN

et al., 2015). Entretanto, não houve cobertura de leituras para esta região em específico no transcriptoma de Las no intestino do ACP, corroborando a ausência de SC2 nas linhagens de Las do Brasil com perfil genômico idêntico a Las 9PA (SILVA et al., 2021), assim como no isolado Las CoFLP1 da Colômbia, outro isolado da América do Sul com o genoma sequenciado (WANG et al., 2021). B2I23_RS05520 e B2I23_RS05445 são codificadas no profago do tipo 3 presente em Las e figuram entre os genes com maiores quantidades de leituras, podendo haver um viés no caso de B2I23_RS05520 devido a presença de SC1_gp135, ambos idênticos, o que não ocorre com B2I23_RS05445, por ser exclusivo da profago do tipo 3. Genes cujos produtos estão envolvidos na ativação gênica foram expressos (SC1_gp115 terminasse, SC1_gp195 exonuclease, SC1_gp210 DNA polimerase A e SC1_gp220 helicase). A ausência de leituras para o gene SC1_gp090 (proteína principal do capsídeo) e SC1_gp110 (holina) no intestino do psílídeo, indica ausência de formação de partículas virais. Entretanto, é baixa a similaridade de sequência entre SC1_gp090 e o isolado 9PA de Las do Brasil (SILVA et al., 2021) e do isolado CoFLP da Colômbia (WANG et al., 2021) e enquanto o genoma de Las do Brasil não estiver completamente sequenciado, a presença deste gene não pode ser confirmada e a ausência de expressão em psílídeos não é conclusiva. A expressão de SC2_gp020, que não seria esperada na ausência do profago do tipo 2, pode ser decorrente de rearranjo entre as regiões 3' e 5' destes profagos, visto que ambas partes estão presentes no isolado tipo Las 9PA, indicando rearranjos (SILVA et al., 2021). A expressão dos genes tardios, ou '*late genes*', em SC1, mesmo que não seja de todos os genes preditos, foi marcante no intestino do psílídeo (Figure 5), demonstrando que a repressão de genes do

profago no psílídeo, ao menos no intestino, deva ser específica, pois a holina (SC1_gp110) não foi expressa, assim como genes adjacentes (JAIN et al., 2017b).

Enquanto em Lso 44 genes para proteínas hipotéticas não foram expressos no corpo de *B. cockerelly* (IBANEZ et al., 2014), em Las, 35 genes que codificam proteínas hipotéticas não foram expressos no intestino de *D. citri*. De forma semelhante, uma endonuclease do tipo VRR-NUC não foi expressa em ambos os genomas (CKC_RS01050 e B2I23_RS05600). Não foi identificada a expressão de quatro de cinco genes precedentes ao ponto de inserção do profago do tipo 3 no cromossomo bacteriano (ZHENG et al., 2018).

A análise de mapeamento evidenciou uma quantidade expressiva de genes de Las transcritos durante o processo inicial de colonização do intestino de *D. citri*. Sugere-se que estes genes sejam vitais para o sucesso da colonização da bactéria no inseto vetor, pois a cobertura de leituras aumentou com o maior período de alimentação do psílídeo em plantas infectadas com Las. Vislumbra-se que estes achados possam auxiliar na evolução da compreensão da expressão de genes e interação de Las com o seu vetor. São informações fundamentais na busca de alvos que possam ser utilizados em estratégias biotecnológicas visando a inibição da multiplicação da bactéria no inseto vetor, consequentemente impedindo a aquisição e transmissão de Las por *D. citri*.

5 CONCLUSÕES

- i) O RNA-Seq a partir de amostras de intestinos de *D. citri*, foi uma técnica eficiente para a identificação de genes expressos nas primeiras fases de colonização da bactéria no psílídeo, pois aproximadamente 95% dos genes preditos no genoma de Las foram mapeados;
- ii) A identificação de genes transcritos foi dependente do período de acesso à aquisição, quanto maior o tempo em que os insetos permaneceram se alimentando nas plantas, maior a cobertura do sequenciamento;
- iii) Genes dos profagos SC1 e do tipo 3 são expressos, de ambas regiões inicial e tardia nos profagos, sem, entretanto, caracterizar entrada no ciclo lítico e dois genes dos profagos figuram entre os dez mais expressos no transcriptoma.

REFERÊNCIAS

- ABBÀ, S., GALETTO, L., CARLE, P., CARRÈRE, S., DELLEDONNE, M., FOISSAC, X., PALMANO, S., VERATTI, F., MARZACHÌ, C. (2014). RNA-Seq profile of flavescentia dorée phytoplasma in grapevine. BMC Genomics. 15:1088. doi: 10.1186/1471-2164-15-1088
- AMMAR, E.D., ROBERT, G., SHATTERS Jr., R.G., LYNCH C., HALL D.G. (2011a). Detection and relative titer of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in the salivary glands and alimentary canal of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) vector of citrus Huanglongbing disease. Ann. Entomol. Soc. Am. 104(3): 526-533. doi: 10.1603/AN10134
- AMMAR, E.D., SHATTERS Jr., R.G., HALL, D.G. (2011b). Localization of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, associated with citrus Huanglongbing disease, in its psyllid vector using fluorescence in situ hybridization. J. Phytopathology, 159: 726-734. doi: 10.1111/j.1439-0434.2011.01836.x
- AMMAR, E.D., RAMOS, J.E., HALL, D.G., DAWSON, W.O., SHATTERS JR., R.G. (2016). 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. doi: 10.1371/journal.pone.0159594.t006
- ANDRADE, M.O., PANG, Z., ACHOR, D.S., WANG, H., YAO, T., SINGER, B.H., WANG, N. (2019). The flagella of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' and its movement in planta. Molecular Plant Pathology. doi: 10.1111/mpp.12884
- ANDREWS, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. doi: 10.1111/mpp.12884
- BASSANEZI, R.B., LOPES, S.A., MIRANDA, M.P., WULFF, N.A., VOLPE, H.X.L., AYRES, A.J. (2020). Overview of citrus huanglongbing spread and management strategies in Brazil. Trop Plant Pathol. 45:251-264. doi: 10.1007/s40858-020-00343-y.
- BERGAMIN FILHO, A., INOUE-NAGATA, A.K., BASSANEZI, R.B., BELASQUE JR, J., AMORIM, L., MACEDO, M.A., BARBOSA, J.C., WILLOCQUET, L., SAVARY, S. (2016). The importance of primary inoculum and area-wide disease management to crop health and food security. Food Sec 8:221-238. doi: 10.1007/s12571-015-0544-8
- BOLGER, A.M., LOHSE, M., USADEL, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics, 30: 2114-20. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170

BOVÉ, J.M. (2006) Huanglongbing: A destructive, newly emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88: 7-37. doi: 10.4454/jpp.v88i1.828

CAPOOR, S.P., RAO, D.G., VISWANATH, S.M. (1967). *Diaphorina citri*: a vector of the greening disease of citrus in India. *Indian Journal of Agricultural Science* 37:572-576.

CANALE, M.C.; TOMASETO, A.F., HADDAD, M.L., COLETTA-FILHO, H.D., LOPES, J.R.S. (2017). Latency and Persistence of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in Its Psyllid Vector, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) *Phytopathology*, 107:264-272. doi: 10.1094/PHYTO-02-16-0088-R

CARMO-SOUZA, M., GARCIA, R.B., WULFF, N.A., FERERES, A., MIRANDA, M.P. (2020). Drench Application of Systemic Insecticides Disrupts Probing Behavior of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) and Inoculation of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Insects*, 11, 314. doi: 10.3390/insects11050314

CASJEANS, S. (2003). Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Mol. Microb*, 49(2):277-300. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03580.x

CÍCERO, J.M., FISHER, T.W., BROWN, J.K. (2015). Localization of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' and evidence for surface appendages in Potato Psyllid vector. *Phytopathology*. doi: 10.1094/PHYTO-04-15-0088-R

CIFUENTES-ARENAS, J.C., GOES, A., MIRANDA, M.P., BEATTIE, G.A.C., LOPES, S.A. (2018). Citrus flush shoot ontogeny modulates biotic potential of *Diaphorina citri*. *Plos One*. doi: 10.1371/journal.pone.0190563

CREECY, J.P. & CONWAY, T. (2015). Quantitative bacterial transcriptomics with RNA-seq. *Current Opinion in Microbiology*, 23: 133-140. doi: 10.1016/j.mib.2014.11.011

CROUCHER, N.J. & THOMSON, N.R. (2010). Studing bacterial trancriptomes using RNA-seq. *Current Opinion in Microbiology*, 13: 619-624. doi: 10.1016/j.mib.2010.09.009

CRUZ-MUNOZ. M., MUNOZ-BERISTAIN, A., PETRONE, J.R., ROBINSON, A.M., TRIPLETT, E.W. (2019). Growth parameters of *Liberibacter crescens* suggest ammonium and phosphate as essential molecules in the *Liberibacter*-plant host interface. *BMC Microbiol* 19, 222. doi: 10.1186/s12866-019-1599-z

DOSSI, F.C.A., SILVA, E.P., CÔNSOLI, F.L. (2014). Population dynamics and growth rates of endosymbionts during *Diaphorina citri* (Hemiptera, Liviidae) ontogeny. *Microbi Ecol* 68:881-889. doi: 10.1007/s00248-014-0463-9

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. (2009). Complete genome sequence of Citrus Huanglongbing bacterium, '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' obtained through metagenomics. *MPMI*, 22, (8). doi: 10.1094/MPMI-22-8-1011

FLEITES, L., JAIN, M., ZHANG, S., GABRIEL, D.W. (2014). "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" prophage late genes may limit host range and culturability. *Appl. Environ. Microbiol.* 80 (19): 6023-6030. doi: 10.1094/MPMI-22-8-1011

FLORES-DE LA ROSA, F., RODRÍGUEZ-QUIBRERA, C., MATILDE-HERNÁNDEZ, C., SANTILLÁN-MENDOZA, R. (2020). Bioinformatic Analysis of Potential Pathogenicity Effectors of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, Causal Agent of Citrus Huanglongbing. *American Journal of Plant Sciences*, 11, 1319-1330. doi: 10.4236/ajps.2020.118094

FU, S., SHAO, J., ZHOU, C., HARTUNG, J.S. (2016). Transcriptome analysis of sweet orange trees infected with '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' and two strains of Citrus Tristeza Virus. *BMC Genomics*, 17:349. doi: 10.1186/s12864-016-2663-9

GARNIER, M., DANIEL, N., BOVÉ, J.M. (1984). The greening organism is a Gram negative bacterium. *IOCV Conference Proceedings*, 9: 115-124

GHANIM, M., ACHOR, D., GHOSH, S., KONTSEDALOV, S., LEBEDEV, G., LEVY, G. (2017). *Candidatus Liberibacter asiaticus* Accumulates inside Endoplasmic Reticulum Associated Vacuoles in the Gut Cells of *Diaphorina citri*. *Scientific Reports*. doi: 10.1038/s41598-017-16095-w

GHOSH, P.K., MAITI, T.K. (2016). Structure of extracellular polysaccharides (EPS) produced by Rhizobia and their functions in legume-bacteria symbiosis: a review. *Achievements in the Life Sciences*. 10: 136-143. doi: 10.1016/j.als.2016.11.003

GRANINGER, M., NIDETZKY, B., HEINRICHS, D.E., WHITFIELD, C., MESSNER, P. (1999). Characterization of dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase and dTDP-4-dehydrorhamnose reductase, required for dTDP-L-rhamnose biosynthesis in *Salmonella enterica* serovar typhimurium TL2. *J. Biol. Chemistry*. doi: 274(35):25069-25077

HAAS, B.J., CHIN M., NUSBAUM, C., BIRREN, B.W., LIVNY, J. (2012). How deep is deep enough for RNA-Seq profiling of bacterial transcriptomes? *BCM Genomics*, 13:734. doi: 10.1186/1471-2164-13-734

HU, Y., ZHONG, X., LIU, X., LOU, B., ZHOU, C., WANG, X. (2017). Comparative transcriptome analysis unveils the tolerance mechanisms of *Citrus hystrix* in

response to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection. PLoS ONE 12(12): e0189229. doi: 10.1371/journal.pone.0189229

HUNG, T.H., HUNG, S.C., CHEN, C.N., HSU, M.H., SU, H.J. (2004). Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus Huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector-pathogen relationships. Plant Pathology 53: 96-102. doi: 10.1111/j.1365-3059.2004.00948.x

IBANEZ, F., LEVY, J., TAMBORINDEGUY, C. (2014). Transcriptome analysis of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" in its Psyllid Vector, *Bactericera cockerelli*. Plos One. Volume 9 (7) e100955. doi: 10.1371/journal.pone.0100955

INOUE, H., OHNISHI, J., ITO, T., TOMIMURA, K., MIYATA, S., IWANAMI, T., ASHIHARA, W. (2009). Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. Annals of Applied Biology 155: 29-36. doi: 10.1111/j.1744-7348.2009.00317.x

JAGOUÉIX, S., BOVÉ, J.M., GARNIER, M. (1994). The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria. International Journal of Systematic Bacteriology 44: 379-386. doi: 10.1099/00207713-44-3-379

JAIN, M., FLEITES, L.A., GABRIEL, D.W. (2015). Prophage-encoded peroxidase in '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' is a secreted effector that suppresses plant defenses. Mol. Plant Microbe Interact. 28 (12): 1330-1337. doi: 10.1094/MPMI-07-15-0145-R

JAIN, M., FLEITES, L.A., GABRIEL, D.W. (2017a). A small Wolbachia protein directly represses phage lytic cycle genes in "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" within psyllids. mSphere 2:e00171-177. 10.1128/mSphere.00227-17.

JAIN, M., MUNOZ-BODNAR, A., GABRIEL D.W. (2017b). Concomitant loss of the glyoxalase system and glycolysis makes the uncultured pathogen "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" an energy scavenger. Appl Environ Microbiol 83: e01670-17. doi: 10.1128/AEM.01670-17

KATOH, H., MIYATA, S., INOUE, H., IWANAMI, T. (2014). Unique features of a Japanese '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' strain revealed by whole genome sequencing. Plos One 9(9): e106109. doi: 10.1371/journal.pone.0106109

KONSTANTINIDIS, K.T., TIEDJE, J.M. (2004). Trends between gene content and genome size in prokaryotic species with larger genomes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. doi: 10.1073/pnas.0308653100

KRUSE, A., FATTAH-HOSSEINI, S., SAHA, S, JOHNSON, R., WARWICK, E.R., STURGEON, K., MUELLER, L., MACCOSS, M.J., SHATTERS, JR. R.G., HECK, M.C. (2017). Combining 'omics and microscopy to visualize interactions between the Asian citrus psyllid vector and the Huanglongbing pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* in the insect gut. Plos One. doi: 10.1371/journal.pone.0179531

KUMAR, N., LIN, M., ZHAO, X., OTT, S., SANTANA-CRUZ, I., DAUGHERTY, S., RIKIHISA, Y., SADZEWICZ, L., TALLON, L.J., FRASER, C.M., HOTOPP, J.C.D. (2015). Efficient enrichment of bacterial mRNA from host-bacteria total RNA samples. Scientific Reports, 6:34850. doi: 10.1038/srep34850

LEE JA, HALBERT SE, DAWSON WO, ROBERTSON CJ, KEESLING JE, SINGER BH. (2015). Asymptomatic spread of huanglongbing and implications for disease control. Proc. Nat. Acad. Sciences of the United States of America 112(24): 7605-7610. 10.1073/pnas.1508253112

LEONARD, M.T., FAGEN, J.R., DAVIS-RICHARDSON, A.G., DAVIS, M.J., TRIPLETT, E.W. (2012). Complete genome sequence of *Liberibacter crescens* BT-1. Standards in Genomic Sciences 7: 271-283. doi: 10.4056/sigs.3326772

LI, W.B., HARTUNG, J.S., LEVY, L. (2006) Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus Huanglongbing. J. Microbiol. Methods 66: 104-115. doi: 10.1016/j.mimet.2005.10.018

LI, J., PANG, Z., TRIVEDI, P., ZHOU, X., YING, X., JIA, H., WANG, N. (2017). "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" encodes a functional Salicylic Acid (SA) Hydorxylase that degrades SA to suppress plant defence. MPMI, 8: 620-630. doi: 10.1094/MPMI-12-16-0257-R

LIEFTING, L.W., PEREZ-EGUSQUIZA, Z.C., CLOVER, G.R.G., ANDERSON, J.A.D. (2008). A new '*Candidatus Liberibacter*' species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. Plant Dis. 92:1474, doi: 10.1094/PDIS-92-10-1474A

LIN, H., LOU, B., GLYNN, J.M., DODDAPANENI, H., CIVEROLO, E.L., CHEN, C., DUAN, Y., ZHOU, L., VAHLING, C.M. (2011). The complete genome sequence of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*', the bacterium associated with potato zebra chip disease. PLoS ONE, 6:4, e19135. doi:10.1371/journal.pone.0019135

LIN, H., PIETERSEN G., HAN, C., READ, D.A., LOU, B., GUPTA, G., CIVEROLO, E.L. (2015). Complete genome sequence of "*Candidatus Liberibacter africanus*," a bacterium associated with citrus Huanglongbing. Genome Announc 3(4): e00733-15. doi: 10.1128/genomeA.00733-15

- LIU, X., ZHENG, Y., WANG-PRUSKI, G., GAN, Y., ZHANG, B., HU, Q., DU, X., ZHAO, J., LIU, L. (2019). Transcriptome profiling of periwinkle infected with Huanglongbing ('*Candidatus Liberibacter asiaticus*'). *Eur J Plant Pathol* 153:891-906. doi: 10.1007/s10658-018-01607-9
- LIU, X-Q., JIANG, H.-B., LIU, T.-Y., YANG, L., FAN, J.-Y., XIONG, Y., JING, T.-X., LOU, B.-H., DOU, W., WANG, J.J. (2020) A Transcriptomic and Proteomic analysis of the *Diaphorina citri* salivary glands reveals genes responding to *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Front. Physiol.* 11:582505. doi: 10.3389/fphys.2020.582505
- LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *METHODS* 25:402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- MANJUNATH, K.L., HALBERT, S.E., RAMADUGU, C., WEBB, S., LEE, R.F. (2008). Detection of "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" in *Diaphorina citri* and its importance in the management of Citrus Huanglongbing in Florida. *Phytopathology* 98 (4):387-396. doi: 10.1094/PHYTO-98-4-0387
- MARTINELLI, A.F., URATSU, S.L., ALBRECHT, U., REAGAN, R.L., PHU, M.P., BRITTON, M., BUFFALO, V., FASS, J., LEICHT, E., ZHAO, W., LIN, D., D'SOUZA, R., DAVIS, C.E., BOWMAN, K.D., DANDEKAR, A.M. (2012). Transcriptome profiling of citrus fruit response to huanglongbing disease. *PLoS One*, 7(5): e38039. doi: 10.1371/journal.pone.0038039
- MIRA, A., OCHMAN, H., MORAN, N.A. (2001). Deletional bias and the evolution of bacterial genomes. *Trends in Genetics*, 17, 10: 589-596. doi: 10.1016/S0168-9525(01)02447-7
- MIRANDA, M.P., AYRES, A.J. (2020). Asian Citrus Psyllid Management in São Paulo, Brazil. In: QURESHI J., STANSLY P.A., organizers. *Asian Citrus Psyllid: Biology, Ecology and Management of Huanglongbing vector*. 1st ed. Wallingford: CABI; pp. 210-221.
- MOHAMED, A.R., CHAN, C.X., RAGAN, M.A., ZHANG, J., COOKE, I., BALL, E.E., MILLER, D.J. (2020). Comparative transcriptomic analyses of *Chromera* and Symbiodiniaceae. *Environmental Microbiology Reports*, 12, 4: 435-443. doi: 10.1111/1758-2229.12859
- MUNYANEZA, J.E., SENGODA, V.G., CROSSLIN, J.M., GARZÓN-TIZNADO, J.A., CARDENAS-VALENZUELA, O.G. (2009). First Report of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" in Tomato Plants in México. *Plant Dis.* 93:552. doi: 10.1094/PDIS-93-10-1076A
- NAKABACHI, A., NIKOH, N., OSHIMA, K., INOUE, H., OHKUMA, M., HONGO, Y., MIYAGISHIMA, S., HATTORI, M., FUKATSU, T. (2013). Horizontal gene

acquisition of *Liberibacter* plant pathogens from a bacteriome-confined endosymbiont of their psyllid vector. *Plos One* 8(12):e82612. doi: 10.1371/journal.pone.0082612

NARANJO, E., MERFA, M.V., FERREIRA, V., JAIN, M., DAVIS, M.J., BAHAR, O., GABRIEL, D.W., DE LA FUENTE, L. (2019). *Liberibacter crescens* biofilm formation *in vitro*: establishment of a model system for pathogenic '*Candidatus Liberibacter* spp.'. *Scientific Reports*, 9:5150. doi: 10.1038/s41598-019-41495-5

PELZ-STELINSKI, K.S., BRLANSKY, R.H., EBERT, T.A., ROGERS, M.E. (2010). Transmission Parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Psyllidae). *Journal of Economic Entomology*, 103 (5). doi: 10.1603/EC10123

PORANKIEWICZ, J., WANG, J., CLARKE, A.K. (1999). New insights into the ATP-dependent Clp protease: *Escherichia coli* and beyond. *Mol. Microb.* 32(3): 449-458. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01357.x

PRASAD, S., XU, J., ZHANG, Y., WANG, N. (2016). SEC-Translocon Dependent Extracytoplasmic Proteins of *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Front Microbiol.* 7:1989. doi: 10.3389/fmicb.2016.01989

SÄLLSTRÄM, B., ANDERSSON, G.E. (2005). Genome reduction in the α -Proteobacteria. *Current Opinion in Microbiology* 8, 5: 579-585. doi: 10.1016/j.mib.2005.08.002

SELVARAJ, V., MAHESHWARI, Y., HAREJI, S., CHEN, J., MCCOLLUM, T.G., YOKOMI, R. (2018). Development of a duplex droplet digital PCR assay for absolute quantitative detection of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. *PLoS One* 13, e0197184. doi: 10.1371/journal.pone.0197184

SENA-VÉLEZ, M., HOLLAND, S.D., AGGARWAL, M., COGAN, N.G., JAIN, M., GABRIEL, D.W., JONES, K.M. (2019). Growth dynamics and survival of *Liberibacter crescens* BT-1, an important model organism for the citrus Huanglongbing pathogen '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. *Environ. Microbiol.* doi: 10.1128/AEM.01656-19

SILVA, P.A., FASSINI, C.G., SAMPAIO, L.S. DEQUIGIOVANNI, G., ZUCCHI, M.A., WULFF, N.A. (2019). Genetic diversity of *Candidatus Liberibacter asiaticus* revealed by Short Tandem Repeats and prophages Typing indicates Population homogeneity in Brazil. *Phytopathology*, 109: 960-971. doi: 10.1094/PHYTO-08-18-0295-R

SILVA, P.A., HUANG, J., WULFF, N.A., ZHENG, Z., KRUGNER, R., CHEN, J. (2021). Genome Sequence Resource of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' strain 9PA from Brazil. *Plant Disease*, 105: 199-201, doi: 10.1094/PDIS-05-20-1018-A

- SPERO, M.A., AYLWARD, F.O., CURRIE, C.R., DONOHUE, T.J. (2015). Phylogenomic analysis and predicted physiological role of the proton-translocating NADH:quinone oxidoreductase (Complex I) across bacteria. *mBio* 6(2). doi: 00389-15. doi:10.1128/mBio.00389-15
- THAPA, S.P., DE FRANCESCO, A., TRINH, J., GURUNG, F.B., PANG, Z., VIDALAKIS, G., WANG, N., ANCONA, V., MA, W., COAKER, G. (2020). Genome-wide analyses of *Liberibacter* species provides insights into evolution, phylogenetic relationships, and virulence factors. *Molecular Plant Pathology*, 00:1-16. doi: 10.1111/mpp.12925
- TATUSOV, R.M., GASPERIM, M.Y., NATALE, D.A., KOONIN, E.V. (2000). The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acid Research* 28:1. doi: 10.1093/nar/28.1.33
- TEIXEIRA, D.C., COLETTE, S., CAROLE, C., MARTINS, E.C., WULFF, N.A., JAGOEIX, S.E., YAMAMOTO, P.T., AYRES, A.J., BOVÉ, J.M. (2008). Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of Huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brazil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 22:139-150. doi: 10.1016/j.mcp.2007.12.006
- TOMIMURA, K., MIYATA, S., FURUYA, N., KUBOTA, K., OKUDA M., SUBANDIYAH, S., HUNG, T.H., SU, H.J., IWANAMI, T. (2009). Evaluation of genetic diversity among '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' isolates collected in Southeast Asia. *Phytopathology*, 99 (9). doi: 10.1094/PHYTO-99-9-1062
- WAIRURI, C.K., VAN DER WAALS, J.E., VAN SCHALKWYK, J. (2012). Theron J. *Ralstonia solanacearum* needs Flp Pili for virulence on Potato. *MPMI*, 25, 4: 546–556. doi: 10.1094/MPMI-06-11-0166
- WANG, Y., KONDO, T., HE, Y., ZHOU, Z., LU, J. (2021) Genome sequence resource of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' from *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) in Colombia. *Plant Disease*. 105:193-195. 10.1094/PDIS-06-20-1249-A
- WULFF, N.A., ZHANG, S., SETUBAL, J., ALMEIDA, N.F., MARTINS, E.C., HAKAKA, R., KUMAR, D., RANGEL, L.T., FOISSAC, X., BOVÉ, J.M., GABRIEL, D.W. (2014). The complete genome sequence of *Candidatus Liberibacter americanus*, associated with Citrus Huanglongbing. *Molecular Plant Microbe Interactions* 27 (2): 163-176. doi: 10.1094/MPMI-09-13-0292-R
- WULFF, N.A., DANIEL, B., SASSI, R.S., MOREIRA, A.S., BASSANEZI, R.B., SALA, I., COLETTI, D.A.B., RODRIGUES, J. (2020). Incidence of *Diaphorina citri* Carrying *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Brazil's Citrus Belt. *Insects*, 11, 672. doi:10.3390/insects11100672

YAN, Q., SREEDHARAN, A., WEI, S., WANG, J., PELZ-STELINSKI, K., FOLIMONOVA, S., WANG, N. (2013). Global gene expression changes in *Candidatus Liberibacter asiaticus* during the transmission in distinct host between plant and insects. *Molecular Plant Pathology* 14 (4): 391-404. doi: 10.1111/mpp.12015

YU, H.Z., LI, N.Y., ZENG, X.D., SONG, J.C., YU, X.D., SU, H.N., CHEN, C.X., YI, L., LU, Z.J. (2020). Transcriptome Analyses of *Diaphorina citri* midgut responses to *Candidatus Liberibacter asiaticus* Infection. *Insects* 11, 171. doi: 10.3390/insects11030171

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. (2011). *Ca. Liberibacter asiaticus* carries an excision plasmid prophage and a chromosomally integrated prophage that becomes lytic in plant infections. *Mol Plant Microbe Interact.* 24(4): 458-468. doi: 10.1094/MPMI-11-10-0256

ZHENG, Z., BAO, M., WU, F., VAN HORN, C., CHEN, J., DENG, X. (2018). A type 3 prophage of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' carrying a restriction-modification system. *Phytopathology*, 108: 454-461. doi: 10.1094/PHYTO-08-17-0282-R.

ZHENG, Y., HUANG, H., HUANG, Z., DENG, X., ZHENG, Z., XU, M. (2021). Prophage region and short tandem repeats of "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" reveal significant population structure in China. *Plant Pathol.* doi:10.1111/ppa.13332

CAPÍTULO 3

***Candidatus* Liberibacter asiaticus E *Candidatus* Liberibacter americanus**

EM COINFECÇÃO DE LARANJEIRA DOCE

E NA AQUISIÇÃO POR *Diaphorina citri*

RESUMO

O HLB é considerado a doença mais destrutiva dos citros, uma vez que não existem variedades comerciais resistentes, a doença provoca redução expressiva da produção e não existem métodos curativos. No Brasil, a doença está associada a *Candidatus* Liberibacter americanus (Lam) e Ca. L. asiaticus (Las), sendo Las cosmopolita e Lam restrita ao Brasil. A partir de 2007 houve a mudança da prevalência e Lam passou de espécie prevalente a ser gradualmente menos comum, com Las atingindo médias superiores a 99% a partir de 2014. São escassas as informações da interação de Lam com o psílídeo, principalmente da sua aquisição pelo psílídeo, assim como a dinâmica de coinfeção de Las e Lam em plantas de citros e a aquisição nesta situação. Os objetivos do presente trabalho foram avaliar a dinâmica da colonização de Las em laranja-doce onde Lam estava estabelecido, gerando situações de dupla infecção. Além disso, avaliar a aquisição pelo inseto, em plantas Lam, Las ou em plantas com ambas as bactérias, e, notadamente, na fase assintomática da doença. Observamos que Las se sobressai em relação a Lam em situações em que a dupla infecção de plantas ocorre. Nos ensaios de aquisição pelo inseto, Las também se sobressaiu em relação à Lam tanto em porcentagem de insetos qPCR positivos para Las, quanto em valores médios de Ct. Nos ensaios de aquisição em planta assintomática, logo após a inoculação por psílídeos infectivos, os níveis de detecção de Las nos psílídeos foram superiores a 50%, enquanto nos ensaios de Lam não passaram de 8%. A detecção de Lam em novos fluxos vegetativos ocorreu a partir do estágio V3 dos brotos e a aquisição de Lam pelo psílídeo atingiu taxas superiores a 80% entre 40 e 67 dias após a emergência dos adultos, indicando aquisição tardia pelo psílídeo.

Palavras-chaves: *Diaphorina citri*; Huanglongbing, *Citrus sinensis*, prevalência bacteriana.

***Candidatus* Liberibacter asiaticus AND *Candidatus* Liberibacter
americanus IN NURSERY TREES CO-INFECTION AND ACQUISITION BY
ASIAN CITRUS PSYLLID**

ABSTRACT

HLB is the most destructive citrus disease worldwide, since there are no resistant commercial varieties, the disease causes a significant reduction in production and there are no curative methods. In Brazil, the disease is associated with *Candidatus* Liberibacter americanus (Lam) and *Ca. L. asiaticus* (Las), Las being cosmopolitan and Lam restricted to Brazil. Since 2007, there was a change in prevalence, and Lam gradually became less common, with Las reaching prevalence with averages greater than 99% since 2014. There is little information on the interaction of Lam with the Asian citrus psyllid (ACP), particularly on its acquisition by ACP, as well as the dynamics of Las and Lam coinfection in citrus plants and their acquisition by psyllids. The objectives of the study were to evaluate the dynamics of Las colonization in sweet orange trees where Lam was firstly established and the occurrence of double infection. In addition, we assessed the acquisition by ACP, in plants infected with Lam, Las or both bacteria, and, notably, in the asymptomatic phase of the disease. We observed that Las stands out in relation to Lam in situations where the double infection of plants occurs. For ACP acquisition assays, Las also stood out in relation to Lam, in both the percentage for Las positive and in bacterial titer. In the assessment of acquisition in asymptomatic plants, short after psyllid inoculation, the detection level of Las in the psyllids were higher than 50% for Las, while in the Lam assays was lower than 8%. The Lam detection in new vegetative flushes started in the V3 stage, and psyllid acquisition of Lam reached levels above 80% between 40 and 67 days after the emergence of adults, indicating a late ACP infection.

keywords: *Diaphorina citri*; Huanglongbing, *Citrus sinensis*; bacterial prevalence.

1 INTRODUÇÃO

A citricultura mundial enfrenta um cenário de prejuízos econômicos devido a incidência do greening ou Huanglongbing (HLB), considerado a doença mais preocupante em função da dificuldade de controle (BOVÉ, 2006).

O HLB está associado a três espécies de bactérias Gram-negativas, restritas ao floema das plantas da família Rutaceae e pertencentes ao gênero ‘*Candidatus*’ Liberibacter, sendo elas: ‘*Candidatus* Liberibacter americanus’ (Lam), ‘*Candidatus* Liberibacter asiaticus’ (Las) e ‘*Candidatus* Liberibacter africanus’ (Laf). Las é uma espécie cosmopolita presente no Brasil; Lam é exclusiva do Brasil e Laf é restrita ao continente africano (JAGOUEIX et al., 1994; Teixeira et al., 2005; BOVÉ, 2006; PIETERSEN et al., 2010), sendo Las e Lam transmitidas pelo inseto vetor *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) (TEIXEIRA et al., 2010).

Este inseto era considerado uma praga secundária na citricultura brasileira, até a sua associação à transmissão do HLB. Desde 2004, principalmente pelo fato de transmitir o HLB de plantas doentes para plantas saudas, é considerado uma das principais pragas da cultura, e está presente nos pomares durante todo o ano. São observados maiores picos populacionais principalmente em períodos quentes e úmidos, como consequência da emissão de novos fluxos vegetativos nas plantas de citros (YAMAMOTO et al., 2001). A dispersão de psílídeos ocorre com maior frequência no final do inverno e primavera no cinturão citrícola paulista, período em que ocorrem novas brotações (ZORZENON et al., 2020). Estes são fatores adequados para a reprodução do inseto (CIFUENTES-ARENAS et al., 2018).

Além da maior atenção dada para o inseto, principalmente no que diz respeito ao manejo e controle populacional, que exigem a adoção do manejo conjunto dos produtores (BASSANEZI et al., 2020), existe a necessidade da compreensão de suas interações com as bactérias associadas ao HLB. Diversos trabalhos avaliam a interação de Las com o psílídeo, fatores como aquisição e multiplicação dessa bactéria no inseto são bem elucidados (AMMAR et al., 2016). Para Lam, estão disponíveis poucos trabalhos a respeito de sua interação com o vetor, principalmente no que diz respeito à aquisição (NASCIMENTO, 2010).

Uma característica importante, que dificulta o controle dessa doença, é o tempo que decorre entre a inoculação da bactéria e o início da manifestação dos sintomas foliares, ocorrendo entre quatro a cinco meses após a inoculação das plantas (LOPES & FRARE, 2008; CANALE et al., 2017). Nesse período assintomático, é possível que o inseto adquira a bactéria. Durante o período em que fêmeas de *D. citri* ovipositam e alimentam-se nos fluxos vegetativos, pode ocorrer a inoculação de Las em plantas citros, caso a fêmea esteja infectada por Las e tenha passado o período de latência. Ninfas que emergem nesses fluxos podem adquirir a bactéria enquanto passam pelos demais instares até atingirem a fase adulta (LEE et al., 2015). O adulto alado é o responsável pela disseminação de *Liberibacter* entre as plantas. É importante ressaltar a baixa taxa de transmissão ovariana de Las por *D. citri* (PELZ-STELINSKI et al., 2010). A frequência de aquisição de Las pela progênie do psílídeo na fase assintomática variou de 0 a 83% dos indivíduos (LEE et al., 2015). No modelo proposto em que a alimentação (inoculação) por adulto infectivo no broto infecta subsequentemente as ninfas desse mesmo broto, pomares inteiros podem ser

infectados em meses (LEE et al., 2015). A importância da aquisição assintomática não foi avaliada no caso de Lam, o qual tem menores títulos em citros do que Las (LOPES et al., 2009b).

Lam foi a espécie prevalecente no Brasil desde seu primeiro relato, em 2004, até 2006. A partir desse momento houve uma inversão no predomínio entre Lam e Las, com Las prevalecendo no parque citrícola do Estado de São Paulo (TEIXEIRA et al., 2005, 2008; LOPES et al., 2009; BASSANEZI et al., 2020; Nelson A. Wulff, dados não publicados – vide Figura 2 – Introdução). É sabido que a prevalência de Las a Lam no parque citrícola do Estado de São Paulo está associada a fatores como: a maior tolerância de Las à altas temperaturas, bem como maior taxa de multiplicação em ambos os hospedeiros, planta e psílídeo (LOPES et al. 2009; NASCIMENTO, 2010; BASSANEZI et al., 2020). No entanto, esses fatores, mesmo plausíveis para explicar o maior título bacteriano de Las na planta hospedeira e inseto vetor, não explicam a infecção primária e/ou secundária de apenas uma espécie. Ou seja, mesmo com menor inóculo de Lam em relação a Las nas plantas no campo, tal fato não explica a inibição da disseminação de Lam para outras plantas, ao ponto de praticamente eliminar Lam nos pomares paulistas.

Nossa hipótese, no sentido de prevalência bacteriana, é que Las sobressaia-se em relação a Lam em situação de dupla infecção/colonização. A competição pode estar associada a disputa por espaço e nutrientes, além da maior concentração de Las em relação a Lam. Estas situações trazem vantagens à multiplicação de Las e/ou vantagens quanto à aquisição de Las em relação a Lam por *D. citri*, favorecendo sua disseminação para outra planta e progressão da epidemia de Las. No presente trabalho, foram realizados ensaios em

condições controladas que permitam avaliar a aquisição de plantas assintomáticas e a colonização dupla de Lam e Las em situações de predomínio inicial da população de Lam em relação a Las.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a aquisição de Las e Lam por *Diaphorina citri* em situações de infecção simples e dupla infecção de laranjeira doce e a dinâmica da colonização de Las inoculada por psílídeos em plantas previamente infectadas com Lam.

2.2 Objetivos específicos:

2.2.1 Avaliar a aquisição pelo inseto vetor *Diaphorina citri*, a partir de plantas de laranjeiras doce em infecção simples e em dupla infecção (Lam e Las);

2.2.2 Avaliar a prevalência entre Las e Lam em laranjeira doce em ensaios de dupla infecção;

3 MATERIAL E MÉTODOS

Avaliação da aquisição de *C. Liberibacter americanus* e *C. Liberibacter asiaticus* pelo psílídeo *D. citri* em infecção simples e infecção sequencial das bactérias em laranjeira doce.

3.1 Condições dos ensaios de aquisição em plantas sintomáticas e plantas assintomáticas

3.1.1 Criação de *Diaphorina citri*

Os adultos de *D. citri* utilizados nos ensaios foram provenientes de uma colônia livre de *Ca. Liberibacter* spp., mantida por diversas gerações em casa de vegetação no Fundecitrus. A criação foi realizada em gaiolas, confeccionadas com arestas metálicas e revestidas com tela antiafídica (malha de 200 mesh). Para a criação, plantas de *M. paniculata* originadas de sementes foram podadas a 30 cm de altura para estimular a emissão dos brotos. Após a brotação (0,5 a 1,0 cm de comprimento), as plantas foram colocadas nas gaiolas e liberados 400 adultos com 10-15 dias após a emergência. Os adultos foram mantidos nas gaiolas por sete dias (oviposição). Decorrido esse período, os adultos foram removidos e as plantas com os ovos mantidas nas gaiolas até a obtenção da progênie de adultos.

Gaiolas com plantas de murta contendo ninfas de quarto e quinto instares de *D. citri* foram transportadas para uma sala climatizada (temperatura de 25 ± 2 °C, UR de $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14 h luz/10 h escuro) para emergência dos adultos e manutenção dos insetos em condições ambientais similares ao utilizado nos ensaios. Machos e fêmeas recém-emergidos foram removidos das gaiolas a cada 48 horas e confinados em plantas de *M. paniculata* revestidos com tecido tipo tule para acasalamento e controle de idade dos insetos. A idade dos insetos utilizados em cada ensaio foi abordada nos itens de descrição de cada experimento.

3.1.2 Plantas fonte com *Candidatus Liberibacter asiaticus* ou *Ca. L. americanus*

Plantas de laranjeira doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] variedade Valência, enxertadas em 'limoeiro Cravo' [(*Citrus limonia* (L.) Osbeck)], foram mantidas em casa de vegetação, em sacolas de 4 ou 7 L contendo substrato a base de casca de pinus decomposta (Plantmax citrus, Eucatex, Paulínia, SP, Brasil). Estas plantas estavam i) sadias, nas quais não houve inoculação de *Ca. Liberibacter* ssp.; ii) infectadas com *Ca. L. asiaticus* ou iii) infectadas com *Ca. L. americanus*, mediante enxertia de borbulhão (LOPES & FRARE, 2008). A ausência de infecção (plantas sadias) ou infecção por Lam ou Las foi confirmada múltiplas vezes após a enxertia através de análise de qPCR (LI et al., 2006) e serão descritas nos ensaios de aquisição como plantas sadias, fonte de Lam ou fonte de Las, respectivamente.

3.1.3 Plantas de laranja doce para a aquisição assintomática de *Candidatus Liberibacter asiaticus* ou de *Ca. L. americanus* com a progênie infectiva de *Diaphorina citri*

Para os ensaios de aquisição assintomática foram utilizadas plantas sadias i) mudas produzidas em sacolas plásticas de 4 L, copa de laranjeira doce, enxertadas em limoeiro Cravo, ou ii) mini mudas com a mesma combinação copa/porta enxerto, porém produzidas em tubetes com volume de 280 mL, mantidas em bandejas. Ambos recipientes contendo substrato a base de casca de pinus decomposta (Plantmax citrus, Eucatex, Paulínia, SP, Brasil).

3.1.4 Detecção de *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Ca. L. americanus* em *Diaphorina citri*

A presença de Lam ou Las ou ambos foi realizada com qPCR para psílídeos individualizados. A detecção da presença de Las ou Lam, ou ambas as bactérias nos psílídeos foi realizada seguindo o protocolo descrito em WULFF et al. (2020). Nas reações de qPCR, utilizou-se o kit TaqMan qPCR Master Mix (Ambion/ThermoFisher Scientific), monitorando-se a presença do 16S rDNA de Las e Lam com os iniciadores HLBas (5' GTCGAGCGCGTATGCAA-TACG 3'), HLBam (5' GAGCGAGTACGCAAGTACTAG 3'), respectivamente, com o iniciador HLBr (5' CTACCTTTTTCTACGGGATAACGC 3') a sonda HLBp (5' AGACGGGTGAGTAACGCG 3') (5'FAM/3'BHQ1, Macrogen, Seul, Coréia do Sul) (LI et al., 2006) e do gene '*wingless*' que foi utilizado como controle interno da qualidade das amostras do DNA do psílídeo, com iniciadores DCF (5' TGGTGAAGATGGTTGTGATCTGATGTG 3'), DCR (5' AGTGGCAGCACCTTGCCA 3') e a sonda DCP (5'-TGTGGGCGAGGCTACAGAAC-3') (5'HEX/3'BHQ1, Macrogen) para o monitoramento da presença do DNA de *D. citri* (MANJUNATH et al., 2008).

Cada reação foi composta por 6 µl de TaqMan® qPCR Master Mix, HLBas ou HLBam (0,5 µM), HLBr (0,5 µM), (HLBp, 0,2 µM) para a amplificação da região 16S rDNA de Las ou Lam, e dos iniciadores DCF e DCR (0,35 µM) e a sonda DCP (0,2 µM) para a amplificação do gene '*wingless*' de *D. citri*, e 3 µL do DNA genômico das amostras de DNA dos psílídeos, totalizando 12 µL de volume final em cada reação. Foram utilizados controles negativos (amostras de DNA de psílídeos sadios) e controles positivos (DNA de psílídeos positivos para *Ca. L. asiaticus* ou *Ca. L. americanus*). O ciclo utilizado consistiu na desnaturação inicial

a 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos nas fases de anelamento e extensão.

O *threshold* das sequências alvo foi ajustado manualmente no software StepOnePlus versão 2.3 (ThermoFisher Scientific). Foram considerados positivos para Las e ou Lam, amostras de insetos com valores de *Ct* igual ou menores do que 35,0.

3.1.5 Condições ambientais dos ensaios de aquisição de *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Ca. L. americanus* por *Diaphorina citri* e nomenclatura para classificação da geração dos psílídeos

Todos os ensaios de aquisição descritos a seguir, foram realizados em condições controladas, com temperatura de 26 °C $\pm$ 2, umidade relativa a 70% $\pm$ 5; e fotoperíodo de 14h/10h de luz/escuro.

A idade dos psílídeos utilizados em cada ensaio é abordada especificamente em cada experimento.

Psílídeos sadios adultos criados em plantas de murta (item 3.1.1.1) e que foram transferidos para plantas fonte para Lam ou Las são descritos como parentais.

A progênie de psílídeos que foi gerada em plantas fonte para Lam e/ou Las são descritos como progênie F1.

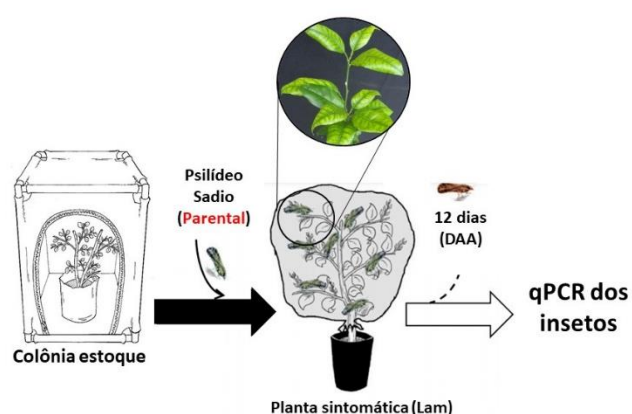
A progênie de psílídeos que foi gerada a partir da geração F1 é descrita como progênie F2.

3.2 Ensaios de aquisição de *Candidatus Liberibacter americanus* e *Ca. L. asiaticus* por *Diaphorina citri*

3.2.1 Experimento 1: Aquisição de *Candidatus Liberibacter americanus* por adultos sadios de *Diaphorina citri*

Psílídeos adultos com 7 a 10 dias após emergência foram confinados em plantas fonte para *Ca. L. americanus* com folhas maduras no estágio V6 (CIFUENTES-ARENAS et al., 2018) e apresentando sintomas típicos de HLB. Os insetos tiveram 12 dias de acesso à aquisição (DAA) (Figura 1). Os ensaios foram repetidos quatro vezes ao longo do tempo, foram confinados 30 psílídeos na repetição 1.1, nos demais, 20 psílídeos por planta e foram utilizadas seis, cinco, quatro e seis plantas respectivamente para os experimentos 1.1, 1.2, 1.3 e 1.4.

Figura 1. Esquema da instalação e condução dos experimentos de aquisição de *Candidatus Liberibacter americanus* por *Diaphorina citri* em plantas de laranjeira doce com folhas maduras, sintomáticas e qPCR positivas para Lam. DAA: dias de acesso à aquisição.



(Fonte: o autor)

Avaliou-se a porcentagem de psílídeos com presença de Lam e o Ct médio para os insetos mantidos por 12 DAA nas plantas fonte de inóculo Lam.

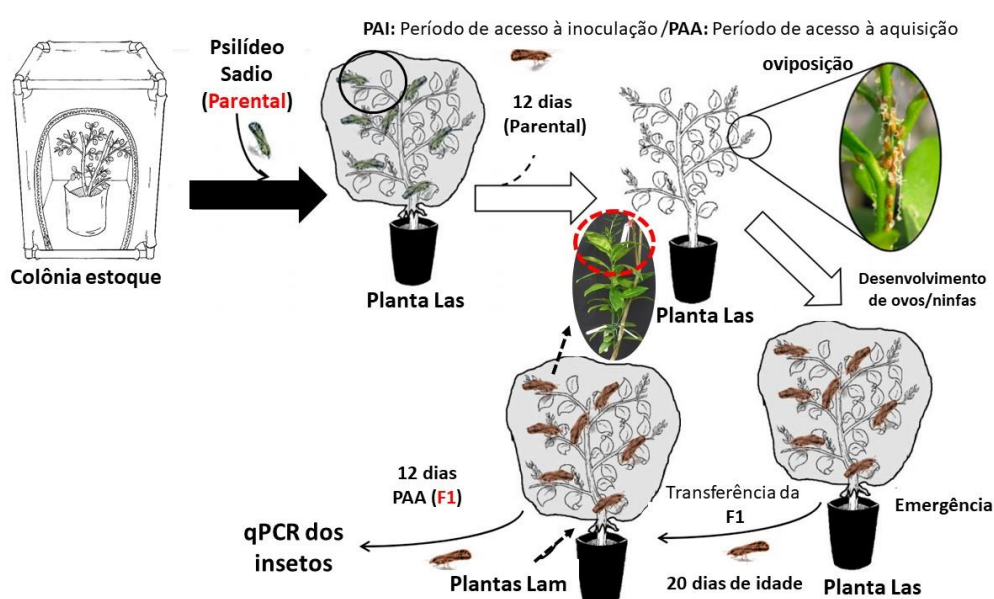
3.2.2 Experimento 2: Aquisição sequencial de *Candidatus Liberibacter americanus* por uma progênie de *Diaphorina citri* gerada em planta fonte de *Ca. L. asiaticus*

Psílídeos adultos com 20 dias após emergência foram confinados em plantas fonte para Las em fluxos vegetativos em estágio V2/V3, com aproximadamente 14 dias após a poda (CIFUENTES-ARENAS et al., 2018). Foram confinados em média 10 psílídeos sadios por broto, os quais tiveram 12 dias de acesso à aquisição (DAA) (Figura 2) e nesse período houve ovoposição. Os adultos foram removidos da planta fonte Las. A progênie F1 desenvolveu-se e foi mantida na mesma planta até completarem 20 dias de emergência dos adultos, tempo superior ao período de latência de Las no inseto (CANALE et al., 2017). Psílídeos criados nas condições ambientais e em plantas fonte de Las como as descritas, tem frequência médias de aquisição de Las acima de 80%, assim como taxas de infectividade também acima de 80% (Lopes SA, *Fundecitrus*, comunicação pessoal). Em seguida, os 50 psílídeos adultos da geração F1 foram transferidos para plantas fontes de Lam contendo fluxos vegetativos naturais, sem estímulo por poda e que apresentavam predominantemente folhas maduras sintomáticas. Após 12 dias nas plantas Lam, os psílídeos vivos foram coletados e analisados individualmente por qPCR quanto à presença das bactérias Las e Lam (Figura 2).

O experimento foi repetido por duas vezes, com duas (experimento 2.1) ou quatro (experimento 2.2) plantas Lam. Avaliou-se a porcentagem de psílídeos

com presença de Las e/ou Lam e o Ct médio para os insetos mantidos por PAA de 12 dias nas plantas Lam.

Figura 2. Esquema representativo dos experimentos de aquisição de *Ca. L. americanus* (Lam) por *Diaphorina citri* criados em plantas fontes para *Ca. L. asiaticus* e transferidas para plantas com Lam com fluxos vegetativos naturais contendo predominantemente folhas maduras sintomáticas.



(Fonte: o autor)

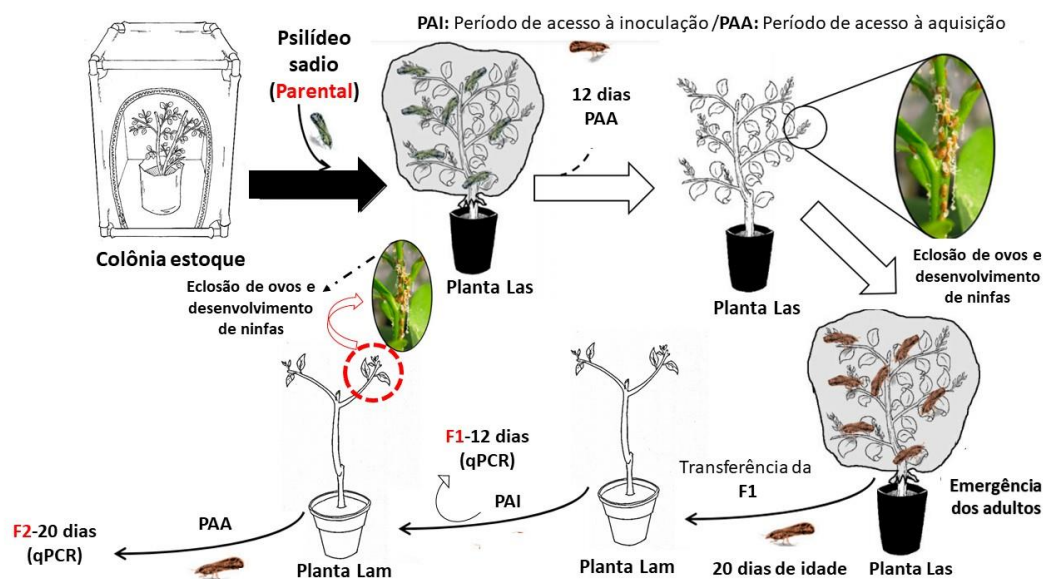
3.2.3 Experimento 3: Aquisição sequencial de *Candidatus Liberibacter americanus* por uma progênie de *Diaphorina citri* gerada em planta fonte de *Ca. L. asiaticus* e aquisição assintomática de *Ca. L. asiaticus* e/ou *Ca. L. americanus* pela progênie F2 de *D. citri*

Psilídeos de geração F1 criados em plantas fonte de Las foram obtidos conforme descrito no item 3.2.2 (Experimento 2) e após 20 dias de emergência, 50 adultos foram transferidos e aprisionados com voil em cada planta com Lam com broto no estágio V2/V3. A brotação nas plantas com Lam foi induzida por

poda. Os psílídeos F1 foram mantidos por 12 dias nas plantas Lam para acesso à aquisição. Em seguida, somente os insetos vivos foram coletados e foi avaliada a porcentagem de psílídeos com presença de Las e/ou Lam e o Ct médio. O experimento foi repetido duas vezes, com 19 (experimento 3.1) ou 20 (experimento 3.2) plantas Lam (Figura 3).

Após a remoção dos psílídeos da geração F1 das plantas Lam, observou-se a presença de ovos em brotos jovens. Com isso, foi avaliada a taxa de aquisição na nova geração de psílídeos (F2). Após a emergência dos primeiros psílídeos adultos, estes foram mantidos confinados nas mesmas plantas por um período de 20 dias (aquisição e latência). Em seguida, os insetos vivos foram coletados e analisados individualmente por qPCR para a presença de Las e/ou Lam e o Ct médio (Figura 3). No caso de Lam foi aquisição em planta sintomática (YAMAMOTO et al., 2006) e no caso de Las a aquisição é no formato de planta assintomática (LEE et al., 2015), reproduzindo a condição epidemiológica do HLB no estado de São Paulo entre os anos de 2004 e 2006.

Figura 3. Esquema representativo dos ensaios de aquisição de *Candidatus* L. americanus (Lam) por *Diaphorina citri* criados em plantas positivas para Ca. L. asiaticus e transferidas para plantas positivas para Lam com brotações jovens induzidos por poda manual. Avaliação das gerações de F1 e F2 de *Diaphorina citri*.



(Fonte: o autor)

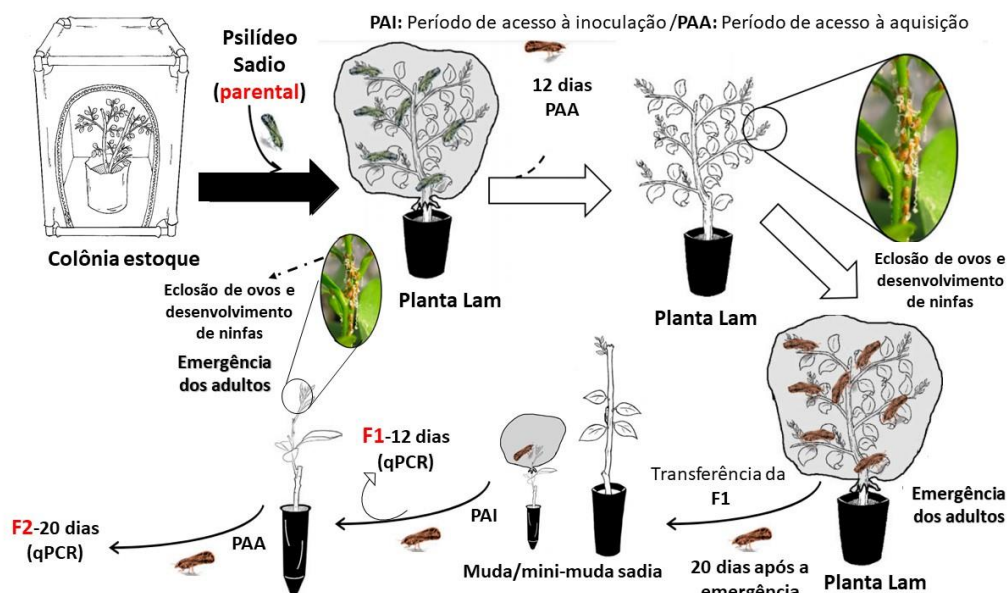
3.2.4 Experimento 4: Aquisição de *Candidatus* Liberibacter americanus por uma progênie de *Diaphorina citri* gerada em planta fonte de Ca. L. americanus e aquisição assintomática de Ca. L. americanus pela progênie F2 de *D. citri*

Psídeos de geração F1 criados em plantas fonte de Lam de forma como conforme descrito no **item 3.2.2** (Experimento 2), exceto que a brotação nas plantas com Lam foi induzida por poda, gerando uma progênie de *D. citri* F1 que foi gerada em planta Lam. Após 20 dias de emergência, adultos foram transferidos e aprisionados com voil em cada planta sadia com broto no estágio V2/V3. O experimento foi repetido quatro vezes, com 6 mudas sadias cada uma

com 50 psíldeos F1 (experimentos 4.1 e 4.2) ou 27 mini mudas saudias cada uma com 10 psíldeos F1 (experimentos 4.3 e 4.4) saudias (Figura 4). Os psíldeos F1 foram mantidos por 12 dias nas plantas saudias para acesso à inoculação (PAI).

Após a remoção dos psíldeos da geração F1 das plantas saudias, observou-se a presença de ovos em brotos jovens. Com isso, foi avaliada a taxa de aquisição assintomática na nova geração de psíldeos (F2). Após a emergência dos primeiros psíldeos adultos, estes foram mantidos confinados nas mesmas plantas por um período de 20 dias (aquisição e latência). Em seguida, os insetos vivos foram coletados e analisados individualmente por qPCR para a presença de Lam e o Ct médio (Figura 4).

Figura 4. Esquema da instalação e condução dos experimentos de aquisição de *Diaphorina citri* nas gerações F1 e F2, a partir de psíldeos criados em plantas positivas para *Ca. L. americanus* e transferidos para plantas saudias.



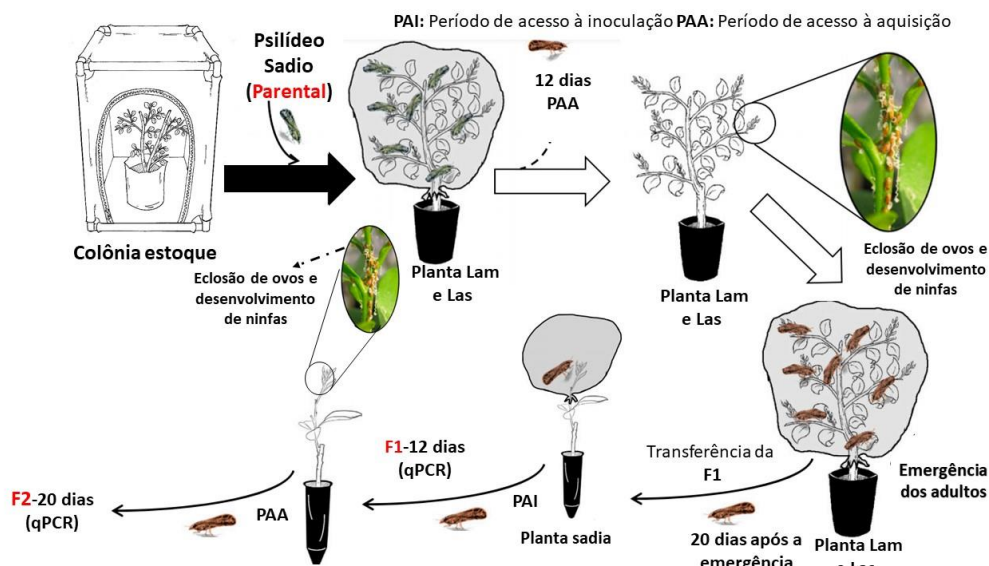
(Fonte: o autor)

Após a remoção dos psíldeos da geração F1 das plantas sadias, observou-se a presença de ovos em brotos jovens. Com isso, foi avaliada a taxa de aquisição assintomática na nova geração de psíldeos (F2). Após a emergência dos primeiros psíldeos adultos, estes foram mantidos confinados nas mesmas plantas por um período de 20 dias (aquisição e latência). Em seguida, os insetos vivos foram coletados e analisados individualmente por qPCR para a presença de Las e do Ct médio (Figura 5).

3.2.6 Experimento 6: Aquisição de *Liberibacter* por uma progênie de *Diaphorina citri* gerada em planta fonte com *Candidatus* *Liberibacter asiaticus* e *Ca. L. americanus* e aquisição assintomática de *Liberibacter* pela progênie F2 de *D. citri*

Psíldeos de geração F1 criados em plantas fonte com coinfecção de Las e Lam da forma como descrito no **item 3.2.2** (Experimento 2), em brotações espontâneas nas plantas fonte, gerando uma progênie de *D. citri* F1. Após 20 dias de emergência, dez adultos foram transferidos e aprisionados com voil em plantas sadias com broto no estágio V2/V3. O experimento teve 19 réplicas, com mini mudas sadias cada uma com 10 psíldeos F1. Os psíldeos F1 foram mantidos por 12 dias nas plantas sadias para acesso à inoculação (PAI) (Figura 6).

Figura 6. Esquema da instalação e condução dos experimentos de aquisição de psílídeos nas gerações F1 e F2, a partir da criação dos insetos em plantas positivas para *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus*.



(Fonte: o autor)

Após a remoção dos psílídeos da geração F1 das plantas saudáveis, observou-se a presença de ovos em brotos jovens. Com isso, foi avaliada a taxa de aquisição assintomática na nova geração de psílídeos (F2). Após a emergência dos primeiros psílídeos adultos, estes foram mantidos confinados nas mesmas plantas por um período de 20 dias (aquisição e latência). Em seguida, os insetos vivos foram coletados e analisados individualmente por qPCR para a presença de *Las* e *Lam* e do Ct médio (Figura 6).

3.2.7 Experimento 7: Curva de aquisição de ‘*Candidatus* Liberibacter americanus’ pela progênie de *Diaphorina citri* desenvolvida em planta fonte ao longo do tempo

A avaliação da evolução da aquisição de Lam foi realizada por meio de amostragens temporais de psílídeos que se desenvolveram em plantas positivas para Ca. Liberibacter americanus.

O ensaio foi composto por quatro plantas, sendo cada planta considerada uma repetição. Anteriormente à realização do ensaio, as plantas foram submetidas à poda manual para indução de novos fluxos vegetativos, para a oviposição de *D. citri* em brotos jovens, aproximadamente 14 dias após a poda, momento em que as brotações estavam no estágio V2/V3, preferencial para a oviposição por *D. citri* (CIFUENTES-ARENAS et al., 2018). Para a oviposição, 10 psílídeos adultos sadios, com aproximadamente 20 dias após emergência e acasalados (parentais) foram confinados em cada planta. Após a ovoposição os adultos foram removidos (semelhante ao ilustrado na Figura 1). A partir da presença de ninfas de 5º instar (tempo zero), foram realizadas amostragens periódicas dos insetos emergidos vivos aos cinco, 10, 15, 30, 38, 44, 53 e 67 dias. Em cada amostragem, cinco insetos de cada planta foram coletados, totalizando 20 insetos e cada inseto foi considerado como uma repetição. Os insetos vivos foram coletados e analisados individualmente por qPCR para a obtenção de valores de Ct e determinação da presença de Lam.

3.2.8 Análise dos dados

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. Os dados de Ct médio (**itens 3.2.1 a 3.2.7**) de *D. citri* foram submetidos ao teste de Barlett, Shapiro-Wilk e Kolgomogorov-Smirnov para análise de normalidade. Como não atenderam esse pressuposto, as médias foram comparadas por testes não-paramétricos. Adotou-se o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($p \leq 0,05$) para comparação de médias de dois tratamentos e o teste de Kruskal-Wallis (método de Dunn) ($p \leq 0,05$) quando múltiplas comparações foram realizadas.

3.3 Amostragem de fluxos vegetativos de laranjeira doce positivas para *Candidatus Liberibacter americanus*

Plantas de laranjeira doce foram enxertadas com borbulhões positivos para *Ca. L. americanus*. Os procedimentos de enxertia foram conduzidos conforme descrito por LOPES & FRARE (2008).

O experimento foi composto pelos seguintes tratamentos: laranjeira doce ('Valência' enxertada sobre 'Limão cravo') utilizadas como controle, enxertadas com borbulhões sadios ($n = 10$ plantas) e plantas Lam enxertadas com borbulhões de laranjeiras doce positivas para *Ca. L. americanus* ($n = 9$ plantas).

As amostragens das plantas iniciaram-se cerca de seis meses após a enxertia. Para isso, as plantas foram podadas a 30 cm acima da base do caule e a partir do aparecimento de novos fluxos vegetativos, estes foram coletados de cada planta e analisados por qPCR para a presença de Lam nas amostras, confirmada pela amplificação da região 16S rDNA da bactéria segundo o protocolo descrito por LI et al. (2006). A classificação dos brotos nos diferentes estádios vegetativos foi feita de acordo com CIFUENTES-ARENAS et al., (2018).

3.4 Prevalência de *Candidatus Liberibacter americanus* e *Candidatus Liberibacter asiaticus* em plantas fonte de *Ca. L. americanus*, após inoculação de *Ca. L. asiaticus* por progênie de *Diaphorina citri* gerada em planta fonte de *Ca. L. asiaticus*

As plantas fontes de Lam foram produzidas da maneira como descritas no item 3.1.2. Para a condução dos experimentos, dois lotes de plantas que apresentavam sintomas de HLB foram utilizadas, permitindo a condução de dois ensaios. Durante a condução dos experimentos, as plantas permaneceram em casa de vegetação, com monitoramento da temperatura (Apêndice A).

A inoculação de plantas Lam com Las foi realizada por progênie de *D. citri* criados em plantas fonte de Las (formato da geração de progênie infectada com Las como na Figura 5). Cada ensaio foi composto pelos seguintes tratamentos: i) plantas sadias (controle); ii) plantas sadias inoculadas com psílídeos infectados por Las, iii) plantas Lam, e iv) plantas Lam inoculadas com psílídeos infectados por Las, gerando dupla infecção (Lam e Las), foram confinados 50 psílídeos por planta.

Para a avaliação da evolução da infecção de Las e Lam nas plantas, os ramos da copa das plantas foram identificados e avaliados individualmente quanto a presença de ambas as bactérias, as coletas foram realizadas em um intervalo médio de 6 meses.

A extração do DNA do material vegetal coletado, foi feita de acordo com o protocolo CTAB (MURRAY & THOMPSON, 1980, modificado por TEIXEIRA et al., 2005). A detecção de Lam e/ou Las foi feita baseada em sequências específicas da região 16S rDNA de *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus* (LI et al.,

2006). Nas reações de qPCR, foi utilizado um Kit TaqMan qPCR Master Mix (Ambion) baseada em sequências específicas da 16S rDNA de *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus*. As quantidades utilizadas para cada reação estão descritas a seguir: 6,0 µL Master mix [1x], os primers de *Ca. L. asiaticus* HLBas (5' GTCGAGCGCGTATGCAA-TACG 3') e HLBam (5' GAGCGAGTACGCAAGTACTAG 3') [0,5 µM] e HLBr (5' CTACCTTTTTCTACGGGATAACGC 3') [0,5 µM], a sonda HLBp (5' AGACGGGTGAGTAACGCG 3') [0,2 µM], 1 µL do DNA genômico, completou-se a reação com 3,32 µL de água ultrapura, totalizando 12 µL por reação.

Para amplificação do DNA, o ciclo utilizado consistiu na desnaturação inicial a 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 58°C por 45 segundos nas fases de anelamento e extensão. Foram utilizados controles negativos (amostras de plantas saudáveis sem o DNA da bactéria) e controles positivos (DNA genômico de plantas fontes com *Ca. L. asiaticus* ou *Ca. L. americanus*). A amplificação via qPCR foi feita em equipamento StepOnePlus thermocycler (Applied Biosystems). Foram considerados positivos os valores de Ct obtidos por qPCR quando estes eram ≤ 35,0.

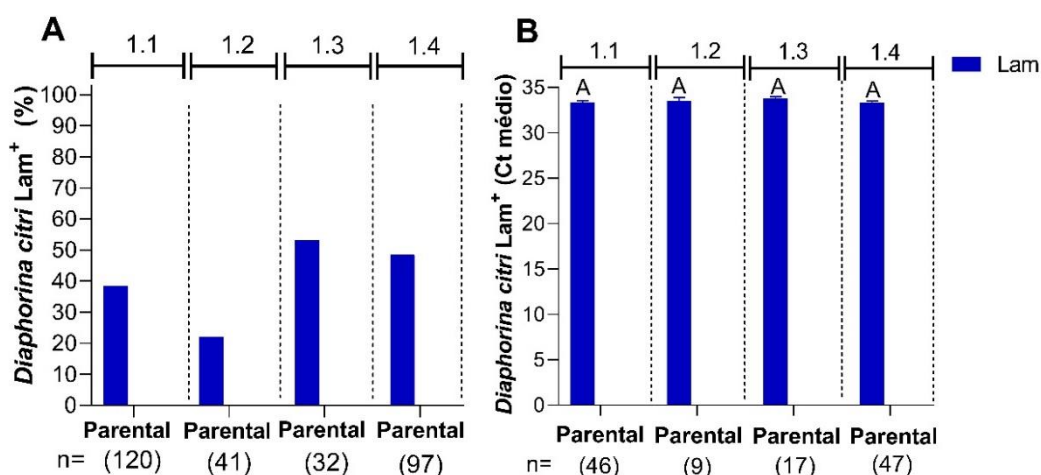
4 RESULTADOS

4.1 Ensaios de aquisição de *Candidatus Liberibacter americanus* e *Ca. L. asiaticus* por *Diaphorina citri*

4.1.1 Experimento 1: Aquisição de *Candidatus Liberibacter americanus* por adultos sadios de *Diaphorina citri* em laranjeira-doce

As taxas médias de aquisição de Lam por psílídeos expostos a 12 DAA em folhas maduras foram de 38,3; 22,0; 53,1 e 48,4% nos experimentos 1.1, 1.2, 1.3 e 1.4, respectivamente. Os valores médios de Ct para Lam observados em psílídeos individualizados foram de $33,37 \pm 0,17$; $33,51 \pm 0,38$; $33,77 \pm 0,22$ e $33,30 \pm 0,18$ nos experimentos 1.1, 1.2, 1.3 e 1.4, respectivamente (Figura 7).

Figura 7. Porcentagem média (A) e Ct médio (B) de *Candidatus Liberibacter americanus* em adultos de *Diaphorina citri* com 12 dias de acesso à aquisição (DAA) em planta fonte de *Ca. L. americanus* com folhas maduras e sintomáticas. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Kruskal Wallis/Dunn a 5% de probabilidade.



(Fonte: o autor)

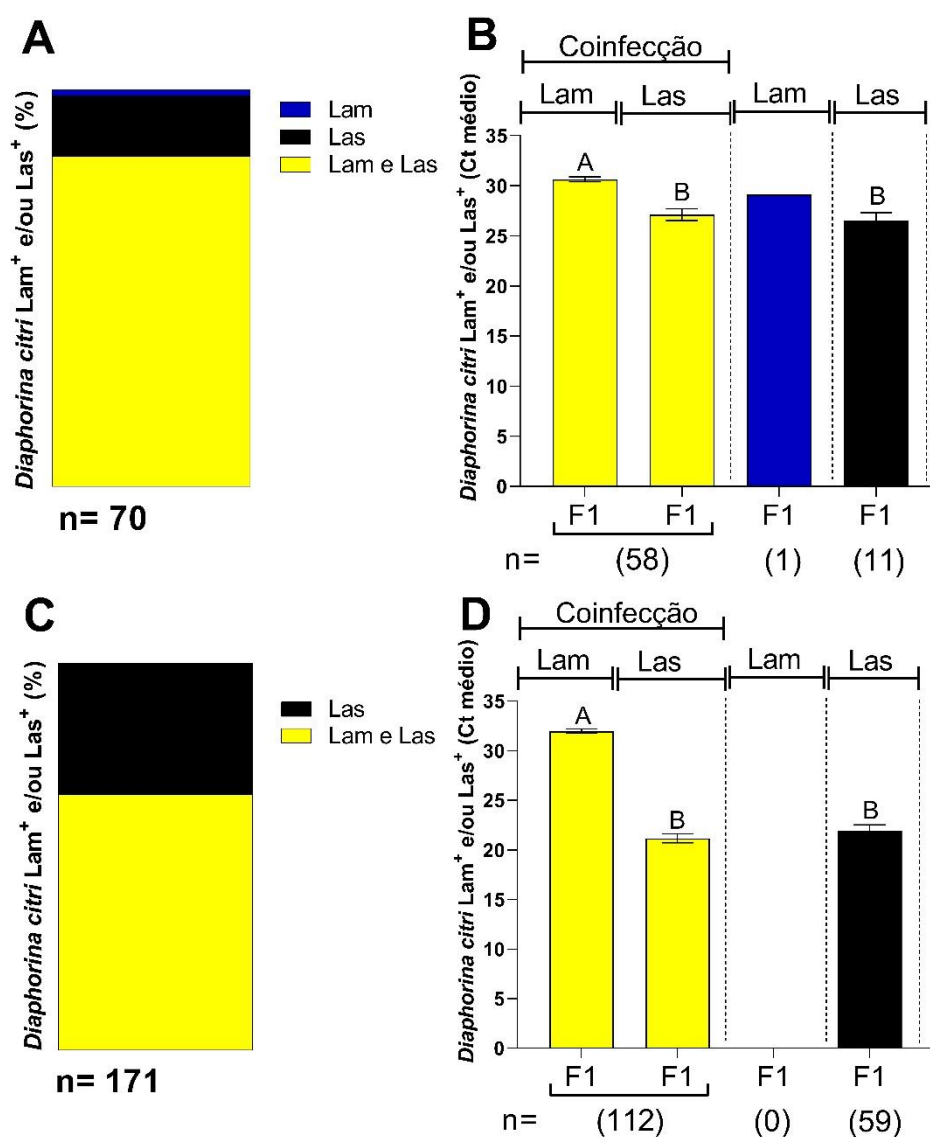
4.1.2 Experimento 2: Aquisição cruzada de *Candidatus Liberibacter americanus* por *Diaphorina citri*: criação em laranjeiras-doce positivas para *Candidatus Liberibacter asiaticus* e transferidos para fluxos vegetativos naturais de laranjeiras-doce positivas para *Ca. L. americanus*: análise da geração F1

A porcentagem média de aquisição de Las e/ou de Lam pela progênie de psílídeos (geração F1) gerados em planta fonte Las e que teve 12 dias de confinamento em plantas fonte de Lam, foi de 82,9% dos psílídeos com ambas as bactérias (coinfecção de Las e Lam) 1,4% com Lam e 15,7% dos psílídeos com Las no experimento 2.1 (Figura 8A). O Ct médio de Las e Lam em psílídeos que tinham ambas as bactérias (coinfectedos) foi de $27,10 \pm 0,58$ para Las e $30,63 \pm 0,25$ para Lam (Figura 8B). Em psílídeos com infecção simples (Las ou Lam), o Ct médio observado para Las foi de $26,50 \pm 0,81$, enquanto somente um psílídeo foi positivo para Lam, com Ct de 29,12 (Figura 8B).

No experimento 2.2, a porcentagem média de aquisição na geração F1 foi de 65,5% para psílídeos com ambas as bactérias (coinfecção de Las e Lam) e 34,5% para Las (Figura 8C). Não houve detecção isolada de Lam em psílídeos.

O Ct médio de Las e Lam em psílídeos com ambas as bactérias (coinfectedos) foi de $21,16 \pm 0,45$ para Las e $31,97 \pm 0,20$ para Lam (Figura 9D). Em psílídeos com infecção simples por Las, o Ct médio observado foi de $21,91 \pm 0,62$ (Figura 8D).

Figura 8. Porcentagem (A e C) e Ct médio (B e D) no experimento 2.1 (A e B) e no experimento 2.2 (C e D), de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) e *Candidatus Liberibacter americanus* (Lam) em adultos de *Diaphorina citri* gerados em plantas fonte de Las (geração F1) e posteriormente confinados e mantidos por 12 dias em planta fonte de Lam contendo folhas maduras e sintomáticas. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Kruskal Wallis/Dunn a 5% de probabilidade.



(Fonte: o autor)

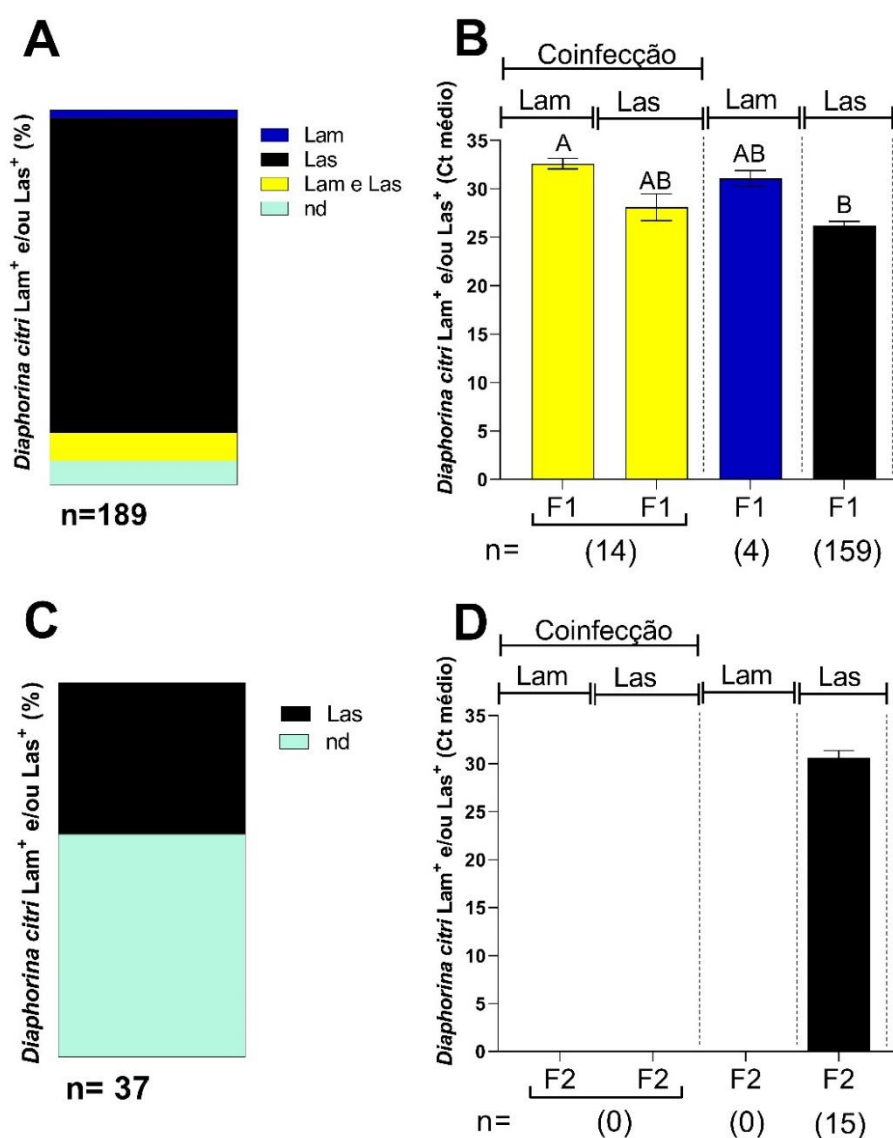
4.1.3 Experimento 3: Aquisição cruzada de *Candidatus Liberibacter americanus* por *Diaphorina citri*: criação em laranjeiras-doce positivas para *Candidatus Liberibacter asiaticus* e transferência para brotações induzidas por poda em laranjeiras doce positivas para *Ca. L. americanus*: análise das gerações F1 e F2

No experimento 3.1, a porcentagem média de aquisição de Las e/ou de Lam pela progênie de psílídeos (geração F1) gerada em planta fonte Las e que teve 12 dias de acesso à inoculação (PAI) em planta fonte de Lam, foi de 7,4 % dos psílídeos com ambas as bactérias (coinfecção de Las e Lam), 2,1% somente com Lam e 84,1 % dos psílídeos somente com Las (Figura 9A), enquanto 12 indivíduos não tiveram Liberibacter (6,3 %).

O Ct médio de Lam e Las na geração F1 de *D. citri* foi de $32,60 \pm 0,55$ e $28,10 \pm 1,39$, respectivamente, em insetos com ambas as bactérias (coinfecção). Para os psílídeos em que houve detecção apenas de Lam, o Ct médio foi de $31,08 \pm 0,82$, enquanto em psílídeos em que houve detecção apenas de Las, o Ct médio foi de $26,22 \pm 0,43$ (Figura 9B).

Na progênie F2 de *D. citri* não houve psílídeos que tenham adquirido Lam, seja em coinfecção ou em infecção simples. Em 40,5% das amostras foi detectado Las (infecção simples), com Ct médio de $30,61 \pm 0,75$ (Figura 9D).

Figura 9. Porcentagem (A e C) e Ct médio (B e D) de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) e *Candidatus Liberibacter americanus* (Lam) em adultos de *Diaphorina citri* criados (geração F1) em plantas fonte de Las e posteriormente confinados e mantidos por 12 dias em planta fonte de Lam contendo folhas maduras e sintomáticas (A e B). Psílídeos adultos da geração F2 (C e D) que tiveram acesso à aquisição assintomática (experimento 3.1). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Kruskal Wallis/Dunn a 5% de probabilidade.



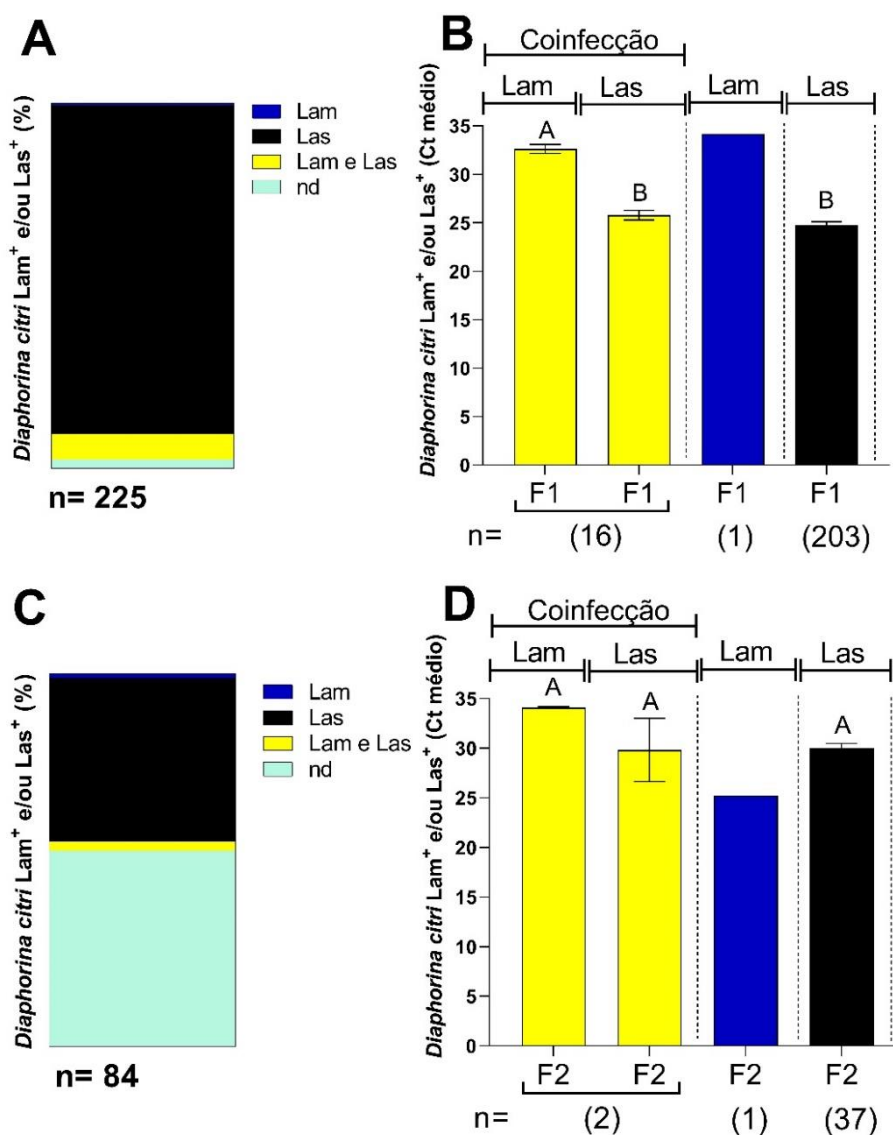
(Fonte: o autor)

A porcentagem média de aquisição de Las e/ou de Lam no experimento 3.2 pela progênie de psílídeos (geração F1) gerada em planta fonte Las e que ficaram 12 dias confinados em planta fonte de Lam, foi de 7,1 % dos psílídeos com ambas as bactérias (coinfecção de Las e Lam), 0,4 % somente com Lam e 90,2 % dos psílídeos somente com Las (Figura 9A), enquanto 2,2 % dos psílídeos não tiveram *Liberibacter*.

O Ct médio observado na geração F1 foi de $32,62 \pm 0,46$ e $25,79 \pm 1,50$ para Lam e Las, respectivamente, em insetos com ambas as bactérias (coinfecção). Em apenas um psílídeo foi detectado Lam (infecção simples) e o Ct foi 34,18. Para os psílídeos em que foi detectada apenas a presença de Las, o Ct médio foi de $24,76 \pm 0,38$ (Figura 10B).

As porcentagens médias de aquisição pelos psílídeos na progênie F2 que tiveram acesso à aquisição em planta assintomática, foram de 44, 1,2 e 2,4 % para Las, Lam e dupla infecção (coinfecção), respectivamente (Figura 10C). Em 52,4 % dos psílídeos analisados não foi detectado Las ou Lam (Figura 10C). O Ct médio observado na geração F2 foi de $34,10 \pm 0,09$ e $29,83 \pm 3,19$ para Lam e Las, respectivamente, em insetos com ambas as bactérias (coinfecção). Em apenas um psílídeo foi detectado Lam (infecção simples) e o Ct foi 25,22. Nos psílídeos em que foi detectada apenas a presença de Las, o Ct médio foi de $30,04 \pm 0,45$. (Figura 10D).

Figura 10. Porcentagem (A e C) e Ct médio (B e D) de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) e *Candidatus Liberibacter americanus* (Lam) em adultos de *Diaphorina citri* criados (geração F1) em plantas fonte de Las e posteriormente confinados e mantidos por 12 dias em planta fonte de Lam contendo folhas maduras e sintomáticas (A e B). Psílídeos adultos da geração F2 (C e D) que tiveram acesso à aquisição assintomática (experimento 3.2). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Kruskal Wallis/Dunn a 5% de probabilidade.

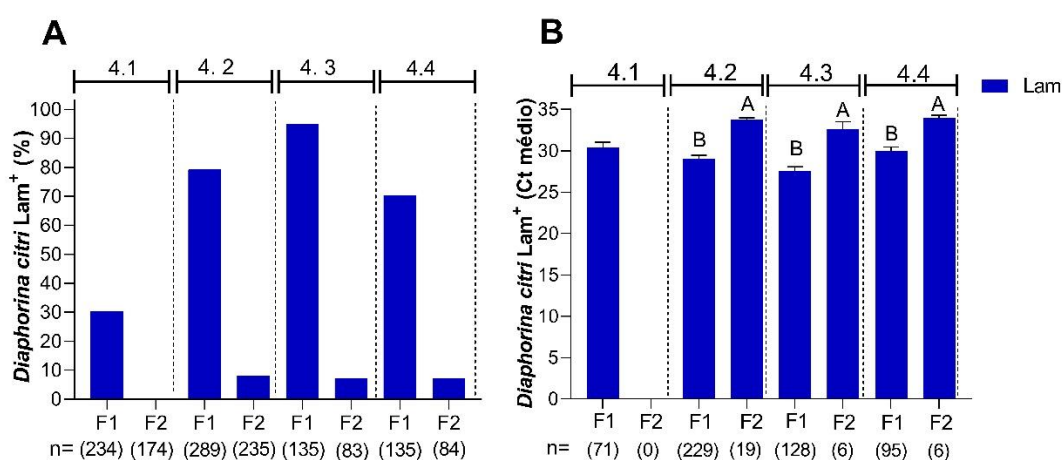


(Fonte: o autor)

4.1.4 Experimento 4: Aquisição por *Diaphorina citri* sadio em brotações induzidas (poda manual) de laranjeiras-doce positivas para *Candidatus Liberibacter americanus*: análise das gerações F1 e F2

A porcentagem média de aquisição de Lam por psílídeos da geração F1 foi de 29,5, 79,2, 94,8 e 70,4%, enquanto o Ct médio foi de $30,45 \pm 0,59$, $29,07 \pm 0,38$, $27,52 \pm 0,54$ e $29,95 \pm 0,15$ para os experimentos 4.1, 4.2, 4.3 e 4.4, respectivamente (Figura 11A). Na geração F2 dos psílídeos, a aquisição assintomática de Lam foi observada em 8,1, 7,2 e 7,1% nos experimentos 4.2, 4.3 e 4.4, enquanto em 4.1 não houve detecção de Lam em nenhum psílídeo. Os valores médios de Ct para Lam foram de $33,74 \pm 0,26$, $32,63 \pm 0,85$ e $34,00 \pm 0,28$ nos experimentos 4.2, 4.3 e 4.4, respectivamente (Figura 11B).

Figura 11. Porcentagem (A) e Ct médio (B) de *Candidatus Liberibacter americanus* (Lam) em adultos de *Diaphorina citri* criados (geração F1) em plantas fonte de Lam e posteriormente confinados e mantidos por 12 dias em brotos de plantas saudáveis. Psílídeos adultos da geração F2 que tiveram acesso à aquisição assintomática (experimento 4).-Médias seguidas de mesma letra, em cada experimento, não diferem entre si pelo teste Wilcoxon-Mann-Whitney a 5% de probabilidade.



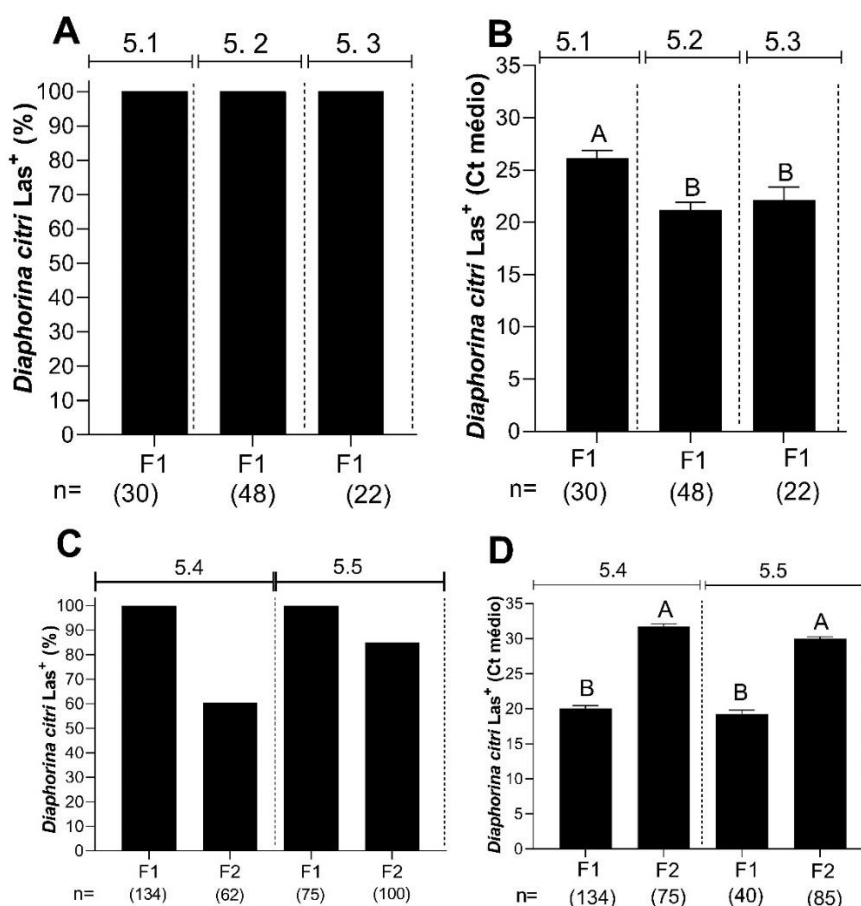
(Fonte: o autor)

4.1.5 Experimento 5: Aquisição por *Diaphorina citri* sadio em brotações induzidas de laranjeiras-doce positivas para *Candidatus Liberibacter asiaticus*: análise das gerações F1 e F2

A porcentagem média de aquisição de Las por psílídeos da geração F1 foi de 100 % nas cinco repetições deste experimento (Figura 12A e C), enquanto o Ct médio foi de $26,16 \pm 0,70$, $21,18 \pm 0,73$, $22,13 \pm 1,25$, $20,05 \pm 0,41$ e $19,25 \pm 0,56$ nos experimentos 5.1, 5.2, 5.3, 5.4 e 5.5, respectivamente (Figura 12B e D). Nos experimentos 5.4 e 5.5, a geração F2 dos psílídeos foi avaliada quanto a aquisição assintomática de Las e foi observado 60,5 e 85 % de presença de

Las nos psíldeos, com Ct médio de Las em $31,77 \pm 0,37$ e $29,97 \pm 0,31$, respectivamente (Figura 12B). O Ct médio de Las na geração F2 foi significativamente menor em relação ao observado na geração F1 de *D. citri*.

Figura 12. Porcentagem (A) e Ct médio (B) de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) em adultos de *Diaphorina citri* criados (geração F1) em planta fonte de *Ca. Liberibacter asiaticus* e posteriormente confinados e mantidos por 12 dias em brotos de plantas saudas. Psíldeos adultos da geração F2 que tiveram acesso à aquisição assintomática (experimento 5). Médias seguidas de mesma letra, em cada experimento, não diferem entre si pelos testes Kruskal Wallis/Dunn (B) e Wilcoxon-Mann-Whitney (D) a 5% de probabilidade.



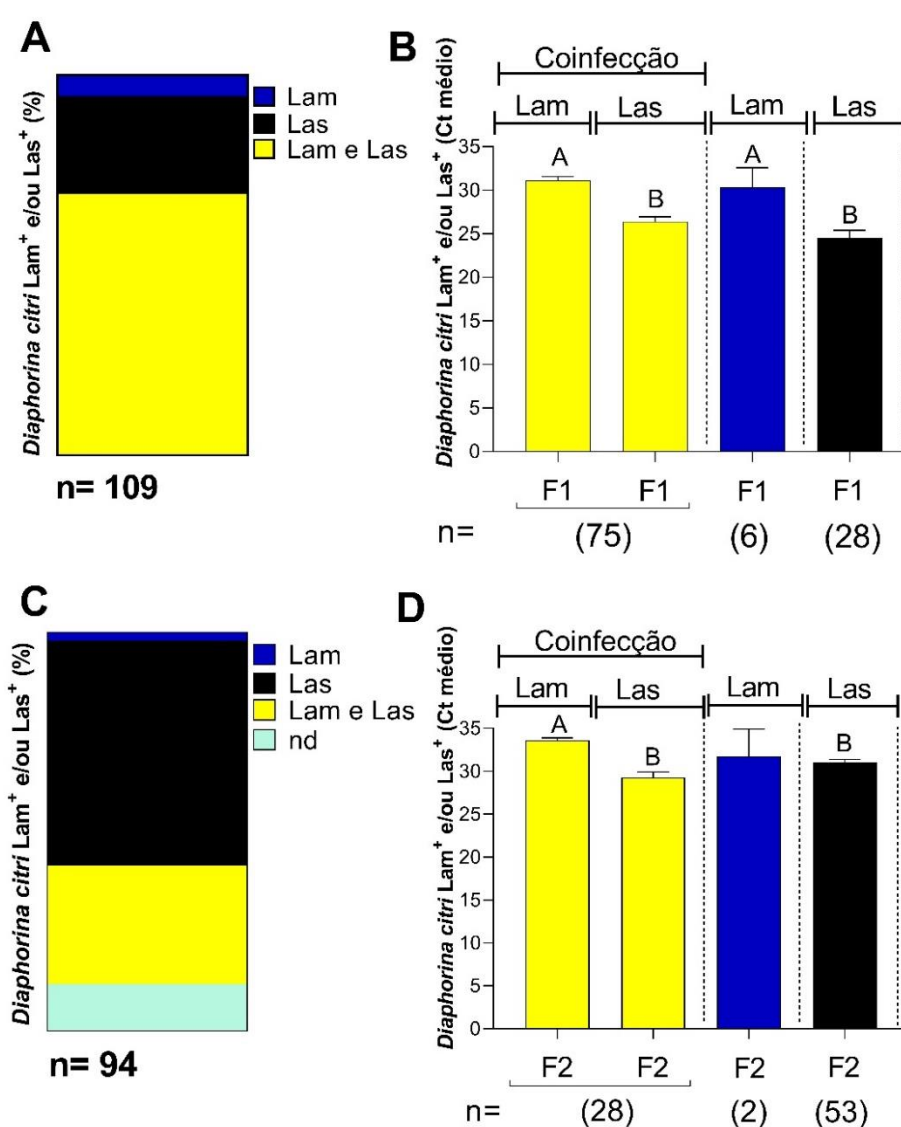
(Fonte: o autor)

4.1.6 Experimento 6: Aquisição por *Diaphorina citri* sadio em brotações e fluxos vegetativos naturais de laranjeiras-doce com dupla infecção (*Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Candidatus Liberibacter americanus*): análise das gerações F1 e F2

A porcentagem de aquisição de *Liberibacter* na geração F1 de adultos oriundos de laranjeiras com dupla infecção de Las e Lam foi de 25,7% para a infecção simples de Las e 5,5% para a infecção simples de Lam. A porcentagem de aquisição de ambas as bactérias (coinfecção) foi de 68,8% (Figura 13A). Os Ct's médios na geração F1 de *D. citri* com infecção simples foram de $24,55 \pm 0,85$ para Las e $30,32 \pm 2,27$ para Lam. Para os psílídeos onde houve a detecção de ambas as bactérias (coinfecção), os valores médios de Ct foram de $26,38 \pm 0,57$ e $31,07 \pm 0,48$, respectivamente para Las e Lam (Figura 13B).

Para a geração F2 de *D. citri*, a presença somente de Las (infecção simples) foi detectada em 56,4 % das amostras, enquanto em 2,1 % dos psílídeos detectou-se somente Lam (infecção simples). A presença de ambas as bactérias foi observada em 29,8 % dos insetos (coinfecção). Não houve detecção de *Liberibacter* em 11,7 % dos psílídeos (Figura 13C). Ainda para a geração F2, os Ct's médios foram de $31,03 \pm 0,37$ e $31,77 \pm 3,14$ respectivamente para Las (infecção simples) e Lam (infecção simples), respectivamente. Nas amostras onde foi detectada as duas bactérias (coinfecção), o Ct médio de Las foi de $29,29 \pm 0,62$ e de Lam foi de $33,62 \pm 0,28$ (Figura 13D).

Figura 13. Porcentagem (A e C) e Ct médio (B e D) de *Candidatus* Liberibacter asiaticus (Las) e *Ca. L. americanus* (Lam) em adultos de *Diaphorina citri* criados (geração F1) em plantas fonte em ramos com coinfeção de Las e Lam e posteriormente confinados e mantidos por 12 dias em plantas saudáveis contendo brotos (A e B). Psílídeos adultos da geração F2 (C e D) que tiveram acesso à aquisição assintomática (experimento 6). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Kruskal Wallis/Dunn a 5% de probabilidade.

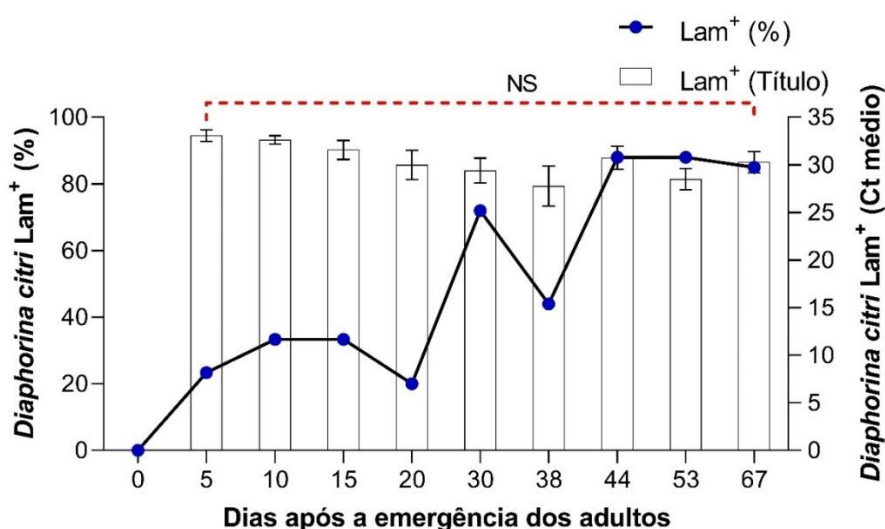


(Fonte: o autor)

4.1.7 Experimento 7: Curva de evolução da aquisição de *Candidatus Liberibacter americanus* na geração F1 de *Diaphorina citri*

A curva de aquisição de Lam na geração F1 de *D. citri* revela que menos de 40% dos psíldeos adquiriram a bactéria até 15 dias após emergência. Nos psíldeos adultos com 30 dias, a aquisição foi de Lam foi de aproximadamente 60% dos psíldeos, enquanto a partir de 44 da emergência, a curva atingiu o pico de aquisição, sem incremento substancial até 67 dias, momento em que o experimento foi finalizado, porém com aquisição acima de 80% (Figura 14). Da mesma forma que a aquisição aumentou com o passar do tempo de vida do psíldeo no broto, o Ct de Lam no psíldeo também aumentou ao longo do período amostrado, entretanto, os valores de Ct não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$).

Figura 14. Curva da evolução temporal da aquisição de *Candidatus Liberibacter americanus* por *Diaphorina citri* na geração F1. NS= Valores médios de Ct não significativos por Kruskal Wallis/Dunn a 5% de probabilidade.



(Fonte: o autor)

4.2 Amostragem temporal de fluxos vegetativos de laranjeira doce positivas para *Candidatus Liberibacter americanus*

A curva de detecção de *Ca. L. americanus* a partir de brotações V1 a V6 indicou que a detecção da bactéria em novos fluxos vegetativos ocorreu a partir do estágio de desenvolvimento do broto V3, sendo observadas porcentagens crescentes de ramos com *Ca. L. americanus* à medida que o broto se desenvolve: 37,5, 44,4, 57,1, e 66,7 %, respectivamente para os estádios V3, V4, V5 e V6 (Tabela 1). Os Ct's médios também aumentaram em função do crescimento do broto e foram de $34,3 \pm 0,5$, $32,3 \pm 2,0$, $30,4 \pm 2,0$ e $29,6 \pm 2,0$, respectivamente para brotos V3, V4, V5 e V6 (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem e Ct médio de *Candidatus Liberibacter americanus* em fluxos vegetativos de laranjeira-doce entre os estádios de desenvolvimento V1 a V6.

		Estádio de desenvolvimento do ramo						
Planta		T0	V1	V2	V3	V4	V5	V6 ^a
Controle	n/N ^b	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	% ^c	0	0	0	0	0	0	0
	Ct médio ^d	0	0	0	0	0	0	0
Lam ^e	n/N	6/9	0/8	0/6	3/8	4/9	4/7	4/6
	%	66,7	0	0	37,5	44,4	57,1	66,7
	Ct médio	23,5±0,4	0	0	34,3±0,5	32,3±2,0	30,4±2,0	29,6±2,0

^a V1 a V6- Classificação dos estádios de desenvolvimento de brotações jovens de laranjeira doce (CIFUENTES-ARENAS et al., 2018);

^b n/N: número de amostras Lam positivas/número de amostras avaliadas

^c %: Porcentagem de amostras Lam positivas

^d Ct médio: Lam; nd –: não detectado.

^e Lam= *Candidatus Liberibacter americanus*

(Fonte: o autor)

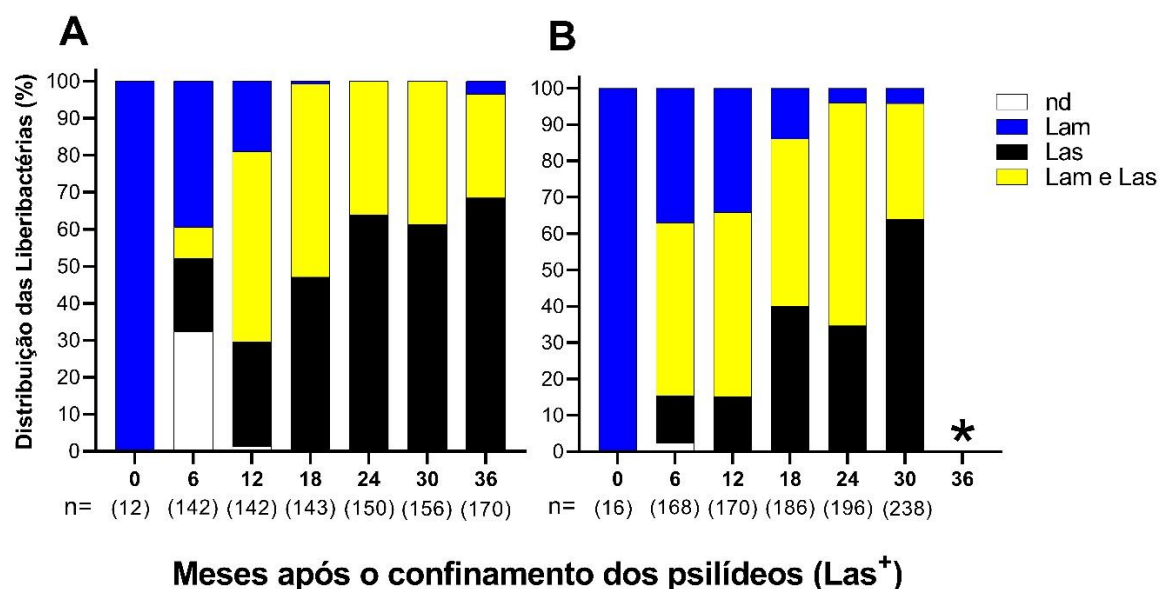
4.3 Prevalência de *Candidatus Liberibacter americanus* e *Candidatus Liberibacter asiaticus* em laranjeiras doce inicialmente inoculadas com borbulhas *Ca. L. americanus* e posteriormente inoculadas com *Ca. L. asiaticus* por meio de fitofagia de adultos de *Diaphorina citri*

No experimento I a porcentagem de ramos com a presença exclusiva de Lam (infecção simples) declinou sucessivamente nos períodos amostrais, iniciando com 100% dos ramos e passando a 39,4, 19,0, 0,7, 0, 0 e 3,4 % para coletas realizadas aos 6, 12, 18, 24, 30 e 36 meses, respectivamente (Figura 15A). A ocorrência de ramos com a presença exclusiva de Las (infecção simples) foi observada nas seguintes proporções: 19,7, 28,7, 47,1, 63,9, 61,4 e 68,5 % aos 6, 12, 18, 24, 30 e 36 meses respectivamente, indicando uma detecção temporal crescente de ramos com presença de Las (Figura 15A). No tempo 0 não houve detecção de Las, somente detecção de Lam, visto que as plantas infectadas com Lam durante dois anos, foram inoculadas com psílídeos Las+ neste momento. Na amostragem de 6 meses, em uma fração de aproximadamente 32,4% dos ramos, ramos novos, não houve colonização e detecção da presença de Lam ou Las, taxa que reduziu para 1,4% aos 12 meses após inoculação. A presença de Lam e Las, demonstrando a ocorrência de coinfeção foi observada em 8,4, 51,4, 52,2, 36,1, 38,6 e 28,1 % dos ramos aos 6, 12, 18, 24, 30 e 36 meses (Figura 15A).

No experimento II a porcentagem de ramos com a presença exclusiva de Lam (infecção simples) também declinou sucessivamente nos períodos amostrais, iniciando com 100% dos ramos e passando a 36,9, 34,2, 13,2, 4,0 e 4,1 % para coletas realizadas aos 6, 12, 18, 24 e 30 meses, respectivamente (Figura 15B). A ocorrência de ramos com a presença exclusiva de Las (infecção

simples) foi observada nas seguintes proporções: 13,1, 15,2, 40,0, 37,7, e 63,9 % aos 6, 12, 18, 24 e 30 meses respectivamente, indicando uma detecção temporal crescente de ramos com presença de Las (Figura 15B), da mesma forma que no experimento I. No tempo 0 não houve detecção de Las, somente detecção de Lam, visto que as plantas infectadas com Lam durante dois anos, foram inoculadas com psílídeos Las+ neste momento. Na amostragem de 6 meses, em uma fração de aproximadamente 2,4% dos ramos, ramos novos, não houve colonização e detecção da presença de Lam ou Las. A presença de Lam e Las, demonstrando a ocorrência de coinfeção foi observada em 47,6, 50,6, 40,1, 61,3 e 32 % dos ramos aos 6, 12, 18, 24, 30 e 36 meses (Figura 15B).

Figura 15. Porcentagem de prevalência das Liberibactérias em plantas de laranja doce ao longo de 3 anos no experimento I (A) e 2,5 anos no experimento II (B). nd = Não detectado; Lam *Candidatus* Liberibacter americanus e Las: *Candidatus* Liberibacter asiaticus.



(Fonte: o autor)

O valor médio do Ct das plantas *Ca. L. americanus* utilizadas como controle do experimento I foi de $23,9 \pm 1,62$ ao início do experimento (4/4 plantas), no entanto, não foram observadas alterações significativas nos Ct's nessas plantas ao longo da condução do experimento.

Na primeira coleta e avaliação dos ramos do tratamento controle *Ca. L. asiaticus* realizada aos seis meses após a infecção via insetos, observou-se que todos os ramos das plantas (14/14 ramos) foram positivas para *Ca. L. asiaticus* com Ct médio $20,9 \pm 0,32$. Não foram observadas alterações significativas nos valores de Ct dessas plantas ao longo da condução do experimento, exceto em um dos períodos, aos 18 meses, em que o Ct médio foi de $17,0 \pm 0,18$.

Nos ensaios de coinfeção do experimento I, o Ct médio de Lam nas plantas antes do confinamento dos psílídeos foi de $26,9 \pm 2,39$ (12/12 plantas). Nas coletas semestrais de ramos as médias de Ct foram semelhantes para Las e Lam, tanto em ramos em que apenas Lam foi detectado, bem como em ramos coinfectados. Aos 24 e 30 meses não foi detectado Lam em ramos isolados, somente em ramos com coinfeção (Tabela 2; Figura 15).

Para o experimento II, o Ct médio das plantas Lam utilizadas como controle foi de $24,3 \pm 2,47$ (4/4 plantas) ao início do experimento. Para esse tratamento, não foram observadas alterações significativas nos Ct's médios dessas plantas ao longo da condução do experimento (Tabela 2).

Na primeira coleta e avaliação dos ramos do tratamento controle Las, realizada aos seis meses após a inoculação com psílídeos Las+, observou-se que todas as plantas (18/18 ramos) foram positivas para Las, com Ct médio de $26,8 \pm 1,29$. Não foram observadas alterações significativas no Ct médio dessas plantas ao longo da condução do experimento (Tabela 2).

Nas plantas com coinfeccção, o Ct médio de Lam antes do confinamento dos psílídeos foi de $25,8 \pm 1,72$ (16/16 plantas). Nas coletas semestrais de ramos observou-se valores médios de Ct semelhantes para Las e Lam, tanto em ramos em que apenas Lam foi detectado, bem como em ramos coinfectados. De maneira geral, as médias de Ct de Las em ramos isoladas na coinfeccção, foram superiores aos observados para Lam em ramos isolados.

Tabela 2. Médias de Ct das Liberibactérias em amostragens semestrais nos ramos ao longo de 36 meses no experimento I e 30 meses no experimento II, em laranjeiras doce sadia, fonte de *Candidatus Liberibacter americanus*, plantas sadias inoculadas por psíldeos infectivos com *Ca. L. asiaticus* e plantas fonte de *Ca. L. americanus* que foram inoculadas por psíldeos infectivos com *Ca. L. asiaticus* e coinfectadas, gerando ramos com infecção simples e ramos com dupla infecção (*Ca. L. americanus* e *Ca. L. asiaticus*).

Amostragem (meses)	Controles						Plantas coinfectadas						
	n/N ^a	Sadio	n/N	Las ^b	n/N	Lam ^c	Ramos com infecção simples				Ramos com coinfecção		
							n/N	Lam	n/N	Las	n/N	Lam	Las
Experimento I													
0	0/12	0	-	-	4/4	23,9±1,62	12/12	26,9±2,39	-	-	-	-	-
6	0/12	0	14/14	20,9±0,32	15/15	21,2±0,41	56/142	22,6±0,17	28/142	26,1±0,62	12/142	23,1±0,37	24,7±0,94
12	0/12	0	23/23	18,2±0,28	15/15	20,0±1,09	27/142	21,5±0,54	40/142	23,0±0,91	73/142	26,2±0,73	25,4±0,65
18	0/12	0	24/24	17,0±0,18	15/15	21,4±0,44	0/143	0	64/143	18,6±0,21	72/143	25,4±0,76	23,1±0,73
24	0/12	0	24/24	19,0±0,27	17/17	22,3±0,49	0/150	0	85/150	20,2±0,17	48/150	25,8±0,61	22,7±0,62
30	0/13	0	26/26	18,5±0,94	17/17	21,1±0,31	0/156	0	81/156	19,7±0,20	51/156	27,6±0,75	20,9±0,44
36	0/10	0	22/22	20,4±0,50	13/14	25,3±0,38	5/170	23,6±0,93	100/170	23,6±0,23	41/170	26,6±0,53	25,9±0,60
Experimento II													
0	0/12	0	-	-	4/4	24,3±2,47	16/16	25,8±1,72	-	-	-	-	-
6	0/12	0	18/18	26,8±1,29	15/15	23,9±0,79	62/168	22,9±0,41	22/168	21,0±0,39	80/168	22,9±0,37	27,8±0,63
12	0/12	0	18/18	26,4±1,72	13/13	20,0±0,36	54/170	20,7±0,41	24/170	19,5±0,48	80/170	23,6±0,59	23,5±0,65
18	0/12	0	20/20	27,0±1,43	14/14	21,8±0,41	23/186	22,8±0,56	66/186	19,5±0,15	76/186	24,7±0,50	25,2±0,72
24	0/12	0	20/20	26,2±1,45	10/10	21,2±0,31	6/196	21,1±0,60	52/196	19,2±0,17	92/196	24,4±0,48	24,0±0,63
30	0/12	0	17/17	27,3±1,58	9/9	22,7±0,38	7/238	24,2±0,82	108/238	21,5±0,30	54/238	26,6±0,61	24,7±0,74

^a n/N: número de amostras Las, Lam e Lam/Las (coinfecção) positivas/número de amostras avaliadas; Las: *Candidatus Liberibacter asiaticus*

^b Ct Las: *Candidatus Liberibacter asiaticus*;

^c Ct Lam: *Candidatus Liberibacter americanus*;

5 DISCUSSÃO

O psílídeo *Diaphorina citri* é o responsável pela disseminação de Las e de Lam no campo. Medidas para a contenção da rápida dispersão da doença preconizam o controle químico do inseto vetor em áreas internas (pomares comerciais) e áreas externas ao pomar (raio de até 5 km das propriedades comerciais) e erradicação de plantas sintomáticas. No entanto, sabe-se que o período entre a infecção das plantas e o aparecimento dos sintomas é variável, com um período latente mínimo próximo a quatro meses, quando então é possível a detecção visual de plantas sintomáticas (BOVÉ, 2006; LOPES & FRARE, 2008; FOLIMONOVA & ACHOR, 2010; COLETTA-FILHO et al., 2014; CANALE et al., 2017).

As bactérias associadas ao HLB foram identificadas quase que simultaneamente nos pomares brasileiros (TEIXEIRA et al., 2005). De acordo com dados do serviço de diagnóstico para os produtores, realizado pelo Fundecitrus, *Ca. L. americanus* era a principal *Liberibacter* presente nas amostras provenientes do campo desde seu primeiro relato, em 2004 até o início de 2007. Houve uma diminuição gradual e temporal na proporção de amostras infectadas com *Ca. L. americanus* concomitantemente com o aumento gradual e temporal na proporção de amostras infectadas com *Ca. L. asiaticus* (LOPES et al., 2007; BASSANEZI et al., 2020). Sabe-se que a temperatura é um fator limitante para *Ca. L. americanus*, ocorrendo a remissão dos sintomas e do Ct em temperaturas superiores a 32°C, bem como a menor multiplicação de Lam em laranja-doce comparado a Las (LOPES et al., 2009a, b). A influência desses fatores na dinâmica de transmissão de Las e Lam não é conhecida.

Fatores como a aquisição de *Ca. L. asiaticus* pelo psílídeo, bem como multiplicação, período de latência, transmissão são bem elucidados e conhecidos (XU et al., 1988; AMMAR et al., 2016; CANALE et al., 2017). Também é sabido como ocorre a translocação dessa bactéria na planta infectada (RAIOL-JUNIOR et al., 2021). Porém, poucos trabalhos comparam a aquisição gradual de *Ca. L. americanus* e *Ca. L. asiaticus*, e não se encontram disponíveis ensaios de aquisição simultânea ou aquisição sequencial de ambas as bactérias (coinfecção) por *D. citri*. NASCIMENTO (2010) é o único autor que relata a aquisição de *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus* por *D. citri*, e relata taxas similares de aquisição de ambas as bactérias pelo psílídeo.

Ca. L. asiaticus movimenta-se rapidamente e predominantemente em direção a novos fluxos vegetativos da planta (RAIOL-JUNIOR et al., 2020). No mais, a poda mecanizada, seja ela para formação e condução das plantas, limpeza, rejuvenescimento e redução da copa, é uma prática comum dos pomares, consequentemente induzindo novas brotações. Somado a esse fator, adultos de *D. citri* ovipositam exclusivamente em brotações, as ninfas eclodidas são dependentes de brotos para o seu desenvolvimento e adultos preferem brotos a folhas maduras para alimentação (NAVA et al., 2007; PAIVA et al., 2019; CIFUENTES-ARENAS et al., 2018). Esta combinação de tropismo de Las pelos tecidos dreno em crescimento, no caso órgãos aéreos como folhas, e a preferência de psílídeos por estes órgãos, cria um ciclo de aquisição e inoculação entre Las e o psílídeo. Este ciclo tem uma notável e ameaçadora característica, que é a aquisição em planta assintomática (LEE et al., 2015), onde ninfas e adultos recém emergidos podem adquirir Las inoculado no mesmo sítio a menos de 15 dias, portanto, um período muito menor do que a planta necessita para

atingir a fase sintomática (LOPES E FRARE, 2008; COLETTA-FILHO et al., 2014).

A detecção de *Ca. L. americanus* em brotações oriundas de poda em laranjeiras-doce ocorreu somente a partir do broto V3. Nas plantas, a partir do estágio V3 do desenvolvimento dos fluxos vegetativos, ocorre a maturação (V4 e V5) e dormência (V6). Nessa fase, a oviposição, eclosão e desenvolvimento das ninfas, bem como a preferência para alimentação são reduzidas sensivelmente (CIFUENTES-ARENAS et al., 2018). De acordo com as informações supramencionadas e o menor Ct de Lam em relação a Las em citros (LOPES et al., 2009a), estes podem ser fatores limitantes para a aquisição de *Ca. L. americanus* pelo psílídeo, além de ser uma desvantagem de *Ca. L. americanus* em relação a *Ca. L. asiaticus*. Nesse tocante, avaliamos a aquisição de *Ca. L. americanus* pelo psílídeo *D. citri* em condições de aquisições em infecção simples, coinfecção com *Ca. L. asiaticus* e em aquisições sequenciais, avaliando a porcentagem do Ct de Las e Lam em psílídeos (individualizados) e a capacidade de aquisição assintomática para ambas espécies.

Por meio da correlação da detecção de *Ca. L. americanus* em novos fluxos vegetativos, somente observada em brotos entre V3 e V6, com o período ovo-adulto de *D. citri*, que dura em média entre 13 - 27 dias, mas é dependente de fatores como temperatura e umidade relativa (CATLING 1969; NAVA et al., 2007) a partir do desenvolvimento do ovo, que varia de 5 a 17 dias (COCUZZA et al. 2016), em uma situação hipotética, onde a oviposição, eclosão e o desenvolvimento das ninfas forem iniciados em um broto V1 de uma planta *Ca. L. americanus*, quando a mesma apresentar ramos vegetativos no estágio V4, aproximadamente, que é variável, mas superior a 15 dias (CIFUENTES-

ARENAS et al., 2018), o adulto do psílídeo estará emergindo, podendo deixar o local (ramo e planta) da oviposição. De acordo com os dados do presente trabalho, provavelmente o inseto não terá adquirido a bactéria nesse intervalo, e se adquirir, será com uma concentração bacteriana relativamente baixa.

Em laranjeiras positivas para *Ca. L. asiaticus*, sabe-se que ninfas adquirem a bactéria com maior eficiência em relação aos adultos, e adultos que adquirirem *Ca. L. asiaticus* na fase ninfal transmitem com maior sucesso a bactéria do que os insetos que as adquirem a bactéria apenas na fase adulta (AMMAR et al., 2016; INOUE et al., 2009; PELZ-STELINSKI et al., 2010). Assim, a aquisição de *Ca. L. americanus* por *D. citri* em brotos somente seria possível próximo a emergência dos adultos, ou seja, os insetos teriam baixa eficiência de aquisição e transmissão de Lam para outras plantas, sendo um outro indicativo de desvantagem da transmissão de *Ca. L. americanus* em relação a *Ca. L. asiaticus*. Entretanto, em 2004 quando o HLB foi encontrado no Brasil, o primeiro levantamento da distribuição da doença realizado menos de meio ano depois, mostrou a ocorrência de Lam em 35 municípios, com uma prevalência de 98% das amostras e 2% para Las, evidenciando que teve condições para ampla disseminação e infecção nos pomares do interior paulista (TEIXEIRA et al., 2005).

A aquisição da bactéria pelo psílídeo ainda na fase assintomática é um gargalo para o controle do HLB, pois não é possível detectar visualmente o inóculo e pelo fato de novos fluxos vegetativos (de plantas outrora saudáveis) se tornarem fontes de aquisição de *Ca. L. asiaticus* por *D. citri* 15 dias após a inoculação de *Ca. L. asiaticus* pelo inseto vetor (LEE et al., 2015). Nossos estudos reproduziram a ‘aquisição assintomática’ de *Ca. L. asiaticus*, por

psílídeos criados em plantas que foram infectadas com Las por seus parentais durante a oviposição. Os parentais infectivos foram criados em plantas fonte de Las e tem usualmente taxas de presença de Las superiores a 50%, podendo atingir 100% (LEE et al., 2015). Para a aquisição em plantas fonte, relatamos a obtenção de psílídeos com 100% de aquisição de Las, e assim como relatado por LEE et al. (2015), obtivemos aquisição assintomática de Las, com porcentagens variáveis de 60,5% a 85%, valores dentro da faixa observada por LEE et al. (2015). Nestes mesmos experimentos constatamos que o Ct de Las dos psílídeos que fizeram a aquisição assintomática foi significativamente menor do que em psílídeos criados em plantas fontes de Las, praticamente três ordens de magnitude menor. Há efeito da concentração de Las da planta fonte e consequente aquisição de Las pelo psílídeo, concentrações mais elevadas suportam maiores porcentagens de psílídeos infectivos (COLETTA-FILHO et al., 2014; LOPES et al. 2017).

Sob condições similares de aquisição ao realizado com Las, observamos que Lam é adquirida por *D. citri* com taxas de 22% a 53,1%, NASCIMENTO (2010) relata aquisição de 30%. São valores menores do que os usualmente obtidos para Las (LEE et al., 2015), e quanto mais tempo é dado ao psílídeo para adquirir Lam e permitir a multiplicação da *Liberibacter* no corpo do psílídeo passando o período de latência (CANALE et al., 2017), a detecção de Lam nos psílídeos da geração F1 é incrementada, mesmo assim, são valores inferiores aos observados para Las. Em psílídeos, o *threshold* do Ct de Las para ser considerado infectivo, e transmitir Las para novas plantas com valores próximos de 20 (UKUDA-HOSOKAWA et al., 2015) para insetos de campo. No caso deste ensaio, o período de aquisição foi de 12 dias, um período menor do que o período

de latência entre 16 e 18 para Las (CANALE et al., 2017). Assim, com o passar do tempo, é esperado que a concentração de Lam no psílídeo possa aumentar e então gere psílídeos infectivos. Efetivamente, psílídeos que foram mantidos por até 67 dias em plantas fontes de Lam, tiveram taxas de aquisição desta *liberibacter* variável entre 20% e 85% e o Ct de Lam no psílídeo sofreu incremento de até três ordem de magnitude, sem apresentar, estatisticamente, diferença significativa.

Os maiores índices de aquisição de *Ca. L. americanus* pelo psílídeo foram obtidos a partir de insetos que ficaram expostos à plantas sintomáticas na geração F1, lembrando que nos ensaios nos quais foi avaliada a aquisição pelo psílídeo nas gerações F1 e F2, a detecção da bactéria na geração F1 foi realizada após 20 dias de acesso à aquisição, somado aos 12 dias de acesso à inoculação em plantas saudas, ou seja, os dados condizem com os resultados obtidos na curva de evolução da aquisição da bactéria pelo inseto e detecção nos brotos, caracterizando uma aquisição lenta de *Ca. L. americanus* pelo psílídeo. A evolução da aquisição de *Ca. L. americanus* pelo inseto, com taxas de aquisição superiores a 60%, foram obtidas somente após 38 dias decorrentes da emergência dos adultos.

Em experimentos de aquisição de Lam por psílídeos em plantas assintomáticas, em situações equivalentes, somente entre 7,1% e 8,1% dos indivíduos (geração F2) adquiriram Lam pela inoculação de seus parentais em laranjeiras-doce saudas, enquanto entre 30,3% e 94,8% dos seus parentais (geração F1) adquiriram Lam na planta fonte. Este perfil é muito semelhante ao observado para Las em aquisição pela F1 e pela progênie F2 em aquisição assintomática. O aumento do tempo de aquisição de Lam pela geração F1 de

psílídeo gera mais psílídeos com Lam (aumenta a taxa de aquisição) e aumenta o valor de Ct de Lam nos psílídeos.

A aquisição de Lam e de Las também foi realizada de forma sequencial, de forma a reproduzir a situação epidemiológica prevalente no campo entre 2004 e 2006: predomínio de plantas infectadas com Lam e índices crescentes (inicial de 2%) de presença de Las em plantas, inclusive com situações de duplas infecções (TEIXEIRA et al., 2010; COLETA FILHO et al., 2007; LOPES et al., 2010). Nestes experimentos, psílídeos foram criados em plantas fonte de Las sob condições ambientais adequadas, para assegurar que tivessem alta taxa de infectividade (LEE et al., 2015; Lopes AS, Fundecitrus, *comunicação pessoal*) e foram então confinados em plantas fontes de Lam. Na planta fonte de Lam os psílídeos tiveram acesso à aquisição de Lam e posteriormente foram analisados para a presença de Las e Lam e também foi avaliada a aquisição assintomática destes psílídeos em plantas sadias, nas quais os psílídeos alimentaram-se e ovipositaram.

Na aquisição sequencial, houve alta de aquisição de Las e de Las em coinfecção e comparativamente a taxa de aquisição individual de Las foi maior do que de Lam. O valor de Ct de Las em plantas de laranjeira doce com coinfecção foi sempre maior do que o valor de Ct de Lam, porém a aquisição de Las foi anterior a Lam, então o fator tempo e a ordem de aquisição podem ter influenciado neste aspecto. Em psílídeos com infecção isolada de Las, o valor de Ct foi semelhante ao da coinfecção e o número de psílídeos que adquiriram somente Las foi expressivo, enquanto somente um psílídeo teve Lam de forma exclusiva. Na repetição desta experimentação com plantas fonte de Lam podadas, a taxa de aquisição de Lam foi muito baixa, o que pode estar

relacionado ao tempo que Lam demora para colonizar o broto e, atinge o broto com o passar do tempo, através da leitura indireta de aquisição pelo psílídeo.

Quando a aquisição sequencial foi realizada com brotação natural, a taxa de aquisição de Lam pelo psílídeo foi maior. Nesta situação de desfavorecimento de aquisição de Lam, foi observada baixa porcentagem de aquisição de Lam por psílídeos em laranjeiras assintomáticas na geração F2, somente um indivíduo em dois ensaios (n avaliado= 121). Na aquisição pela geração F1, a taxa de coinfeção também foi baixa nos dois ensaios, enquanto a aquisição exclusiva de Las foi elevada. Por outro lado, a aquisição assintomática de Las pela geração F2 de psílídeos foi bastante expressiva nos dois ensaios.

Outro fator que pode interferir na aquisição das bactérias pelo psílídeo é a coinfeção de plantas com *Ca. L. americanus* e *Ca. L. asiaticus*. Em ensaios de coinfeção de plantas de laranja doce LOPES et al., 2009a, mostraram diferenças entre os valores de Ct para *Ca. L. americanus* e *Ca. L. asiaticus*, entretanto, o monitoramento das plantas foi realizado no período de cinco e sete meses após a inoculação/infecção, e não em maior intervalo de tempo e em ramos individualizados.

No presente estudo, plantas fonte de *Ca. L. americanus* quando inoculadas com *Ca. L. asiaticus*, tornam-se positivas para *Ca. L. asiaticus* ao decorrer do tempo e um fator marcante é a proporção de ramos onde somente Las foi detectado. Essas informações quando projetadas para a epidemiologia da doença no campo, revelam a maior possibilidade de aquisição e transmissão de *Ca. L. asiaticus* pelo inseto, ou seja, um cenário de favorecimento da aquisição e consequente dispersão de *Ca. L. asiaticus*, baseado na maior probabilidade de aquisição e transmissão dessa espécie pelo inseto vetor. Muito

embora a concentração de Las em citros tenha sido apontado como um fator determinante para a maior aquisição de Las pelo psílídeo em detrimento a Lam (LOPES et al., 2009a), a dinâmica de aquisição de uma ou ambas bactérias por um longo período de tempo a partir da coinfeção de laranjeiras-doce não havia sido determinada.

Em ensaios de coinfeção de laranjeiras doces com Lam e Las, além do incremento marcante do número de ramos em que houve a detecção apenas de Las, tanto no experimento I quanto no experimento II, de uma maneira geral, observou-se a remissão de sintomas severos da doença nas plantas (Apêndice B). Ambas as bactérias, Lam e Las causam sintomas em plantas cítricas, no entanto, plantas infectadas por Lam exibem os sintomas mais severos em relação aos observados em plantas infectadas com Las (LOPES et al. 2009a). Esta característica de Lam pode estar relacionada à ausência de um repressor transcricional responsivo a ferro (Fe) (*rirA*) (WULFF et al., 2014), a consequente inversão das populações de ambas as bactérias nas plantas e prevalência de Las, pode estar, nesse caso, relacionada à remissão dos sintomas severos da doença nas plantas;

Em plantas cujos ramos foram observados a presença de coinfeção de Las e Lam com valores de Ct semelhantes (Tabela 2), foram realizados ensaios de aquisição em brotos de fluxos naturais e posteriormente a aquisição assintomática pela progênie F2 desses psílídeos. Na geração de psílídeos que se desenvolveu nas plantas coinfectadas a maior porcentagem dos psílídeos adquiriu Las e Lam, enquanto que em psílídeos que adquiriram somente um *Liberibacter*, a porcentagem foi sete vezes maior para Las do que Lam. Porém em relação a infecção assintomática na geração F2 dos psílídeos, o número de

psílídeos que adquiriu Las de forma exclusiva foi duas vezes maior ($n = 53$) do que o número de psílídeos que adquiriu Las e Lam em coinfeção ($n = 28$), enquanto somente dois psílídeos adquiriram exclusivamente Lam. Na situação de coinfeção, a concentração de Las foi maior do que a de Lam no psílídeo, em ambas gerações de psílídeo F1 (aquisição em fonte sintomática) e F2 (aquisição assintomática). Este mesmo padrão foi encontrado para psílídeos com Las ou com Lam da geração F1 (infecção simples). Nestes ensaios fica evidente que a concentração de Las é maior do que a de Lam nos psílídeos; há maior taxa de aquisição assintomática de Las do que de Lam, seja em aquisição isolada de Lam, aquisição em planta fonte com coinfeção ou na situação de aquisição sequencial Las e Lam; se a concentração de Lam e de Las no psílídeo é reflexo da concentração de Las em relação à de Lam na planta, ou seja, o mesmo padrão de multiplicação observado em citros é observado no psílídeo, e estas são questões que merecem estudos mais detalhados.

O genoma de *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus* evidencia que estas bactérias possuem características moleculares distintas, mesmo que a colonização de ambas seja exclusiva de vasos de floema das plantas hospedeiras (DUAN et al., 2009; WULLF et al., 2014); Além da maior multiplicação de Las em plantas de laranjeira em relação à Lam e da menor resistência térmica de Lam (LOPES et al., 2009a, b), sabe-se que bactérias também podem evoluir conjuntamente com os organismos que habitam, ou dominar outras espécies que ocupam o mesmo nicho e competem pelo pool de recursos, fatores estes que auxiliam na compreensão da emergência ou declínio de algumas espécies (HIBBING et al., 2010).

Aspectos como a presença de toxinas antimicrobianas, ou bacteriocinas, favorecem a dominância ou sobrevivência de algumas cepas. As bactérias produtoras de bacteriocinas, que são proteínas tóxicas às bactérias não produtoras, tem vantagens adaptativas, como demonstrado para *Escherichia coli* que secreta colicinas (KERR et al., 2002), em cepas de *Enterococcus faecalis* produtoras de Bacteriocina-21 (Bac-21) (KOMMINENI et al., 2015) e em *Pseudomonas chlororaphis* que secretam R-tailocinas (DOROSKY et al., 2017). Estes são casos em que a produção de bacteriocinas são determinantes na competição bacteriana ativa (KOMMINENI et al., 2015). É possível que *Ca. L. asiaticus* utilize mecanismos de competição ativa em sua interação com *Ca. L. americanus*, merecendo essa interação estudos mais detalhados.

Tendo decorrido um longo tempo desde o início da experimentação, a continuidade do acompanhamento do comportamento de ambas as populações de *Liberibacter* spp. nos ensaios de dupla infecção confirmarão de fato que ocorre de fato a prevalência de *Ca. L. asiaticus* em relação à *Ca. L. americanus* e o conseqüente desaparecimento de *Ca. L. americanus* em condições de dupla infecção.

Com base nos resultados obtidos, citando-se tanto a colonização e prevalência de *Lam* e *Las* em laranja doce, quanto aquisição pelo inseto e detecção em novos fluxos vegetativos, pode-se afirmar que estes são fatores envolvidos diretamente na inversão da prevalência de *Las* e *Lam* no campo e na iminência da extinção de *Ca. L. americanus* no parque citrícola no estado de São Paulo.

6 CONCLUSÕES

- i) *Ca. L. asiaticus* se sobressai a *Ca. L. americanus* em concentração e porcentagem média na aquisição pelo psílídeo;
- ii) Nos ensaios de aquisição assintomática da geração F2, as taxas de aquisição foram superiores a 50% em *Ca. L. asiaticus*, enquanto em *Ca. L. americanus* não passam de 8%
- iii) A detecção de *Ca. L. americanus* em novos fluxos ocorre a partir do estágio V3;
- iv) Taxas superiores de aquisição de *Ca. L. americanus* pelo inseto são observadas a partir de 40 dias, indicando uma infecção tardia pelo inseto.
- v) *Ca. L. asiaticus* se sobressai em relação à *Ca. L. americanus* em ensaios de coinfeção de plantas.

REFERÊNCIAS

- AMMAR, E.D.; RAMOS, J.E.; HALL, D.G.; DAWSON, W.O.; SHATTERS, JR. R.G. (2016). 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, 11(7): e0159594.
- BASSANEZI, R.B.; LOPES, S.A.; MIRANDA, M.P.; WULFF, N.A.; VOLPE, H.X.L.; AYRES, A.J. (2020). Overview of citrus huanglongbing spread and management strategies in Brazil. Trop. Plant Pathol., 45: 251-264.
- BOVÉ, J.M. (2006). Huanglongbing: A destructive, newly emerging, century-old disease of citrus. J. Plant Pathol., 88: 7-37.
- CANALE, M.C.; TOMASETO, A.F.; HADDAD, M.L.; COLETTA-FILHO, H.D.; LOPES, J.R.S. (2017). Latency and Persistence of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in Its Psyllid Vector, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) Phytopathol., 107: 264-272.
- CATLING, H.D. (1970). Distribution of the psyllid vectors of citrus greening disease, with notes on the biology and bionomics of *Diaphorina citri*. FAO Plant Protection Bulletin 18:8–15
- CIFUENTES-ARENAS, J.C.; GOES, A.; MIRANDA, M.P.; BEATTIE, G.A.C.; LOPES, S.A. (2018). Citrus flush shoot ontogeny modulates biotic potential of *Diaphorina citri*. PLoS ONE, 13 (1): e0190563.
- COLETTA-FILHO, H.D., CARLOS, E.F., LOTTO, L.L., LUCIANE, F.C., ALVES, K.C.S., PEREIRA, M.A.R., MACHADO, M.A. (2007). Prevalence of *Candidatus Liberibacter* spp. in HLB-diseased citrus plants in São Paulo State, Brazil. Proceedings, 17th IOCV Conference, Turkey.
- COLETTA-FILHO, H.D., DAUGHERTY, M.P., FERREIRA, C., LOPES J.R.S. (2014). Temporal Progression of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' Infection in Citrus and Acquisition Efficiency by *Diaphorina citri*. Appl Environ Microbiol. 104(4).
- COCUZZA, G.E.M., ALBERTO, U., HERNÁNDEZ-SUÁREZ, E., SIVERIO, F., DI SILVESTRO, S., TENA, A., CARMELO, R. (2016). A review on Trioza erytreae (African citrus psyllid), now in mainland Europe, and its potential risk as vector of huanglongbing (HLB) in citrus. Journal of Pest Science 90:1–17.
- DOROSKY, R.J. MYOUNG, YU J.M., PIERSON, L.S., PIERSONA, E.A. (2017). *Pseudomonas chlororaphis* produces two distinct R-tailocins that contribute to bacterial competition in biofilms and on roots. Appl Environ Microbiol 83:e00706-17.
- 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. 2009. Complete genome sequence of citrus huanglongbing

bacterium, obtained through metagenomics. Mol. P. Mic. Interact 22(8): 1011-1020.

FOLIMONOVA, S.Y.; ACHOR, D.S. (2010). Early events of citrus greening (Huanglongbing) disease development at the ultrastructural level. Phytopathol., 100: 949-958.

INOUE, H.; OHNISHI, J.; ITO, T.; TOMIMURA, K.; MIYATA, S.; IWANAMI, T.; ASHIHARA, W. (2009). Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. Ann. Appl. Biol., 155: 29-36.

JAGOUÉIX, S.; BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. (1994). The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria. Int. J. Syst. Bacteriol., 44: 379-386.

LEE, J.A.; HALBERT, S.E.; DAWSON, W.O.; ROBERTSON, C.J.; KEESLING, J.E.; SINGER, B.H. (2015). Asymptomatic spread of huanglongbing and implications for disease control. PNAS, 112: 7605-7610.

LI, W.B.; HARTUNG, J.S.; LEVY, L. (2006). Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus Huanglongbing. J. Microbiol. Methods, 66: 104-115.

LOPES, S.A.; FRARE, G.F.; WULFF, N.A.; FERNANDES, N.G. (2007). Epidemia de huanglongbing (greening) no Estado de São Paulo: provável influência da temperatura e das diferenças em transmissibilidade dos patógenos na evolução da doença. In: Proceedings Workshop sobre Epidemiologia de Doenças de Plantas, 2007, Campos do Jordão, São Paulo, Brazil. p. 69-76.

LOPES, S.A.; BERTOLINI, E.; FRARE, G.F.; MARTINS, E.C.; WULFF, N.A.; TEIXEIRA, D.C.; FERNANDES, N.G.; CAMBRA, M. (2009a). Graft transmission efficiencies and multiplication of '*Candidatus Liberibacter americanus*' and '*Ca. Liberibacter asiaticus*' in citrus plants. Phytopathol., 99: 301-306.

LOPES, S.A.; FRARE, G.F.; BERTOLINI, E.; CAMBRA, M.; FERNANDES, N.G.; AYRES, A.J.; MARIN, D.R.; BOVÉ, J.M. (2009b). Liberibacters associated with citrus Huanglongbing in Brazil: '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' is heat tolerant, '*Ca. L. americanus*' is heat sensitive. Plant Dis., 93: 257-62.

LOPES, S.A.; FRARE, G.F. (2008). Graft Transmission and Cultivar Reaction of Citrus to '*Candidatus Liberibacter americanus*'. Plant Dis., 92: 21-24.

LOPES S.A., FRARE, G.F., CAMARGO, L.E.A., WULFF, N.A., TEIXEIRA, D.C., BASSANEZI, R.B., BEATTIE, G.A.C., AYRES, A.J. (2010). Liberibacters associated with orange jasmine in Brazil: incidence in urban areas and relatedness to citrus Liberibacters. Plant Pathology

LOPES, S.A.; LUIZ, F.Q.B.F.; MARTINS, E.C.; FASSINI, C.G.; SOUSA, M.C.; BARBOSA, J.C.; BEATTIE, G.A.C. (2013). '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'

Titers in Citrus and Acquisition Rates by *Diaphorina citri* Are Decreased by Higher Temperature. *Plant Dis.*, 97: 1563-1570.

LOPES, S.A., LUIZ, F.Q.B.F., OLIVEIRA, H.T., CIFUENTES-ARENAS J.C., RAIOL-JUNIOR, L.L. (2017). Seasonal Variation of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' Titers in New Shoots of Citrus in Distinct Environments. *Plant Disease* 101:583-590.

MANJUNATH, K.L.; HALBERT, S.E.; RAMADUGU, C.; WEBB, S.; LEE, R.F. (2008). Detection of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' in *Diaphorina citri* and its importance in the management of Citrus Huanglongbing in Florida. *Phytopathol.*, 98: 387-396.

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids Rev.*, 8: 4321-4325.

NASCIMENTO, F.E. (2010). Estudos sobre aquisição e concentração de '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' e '*Candidatus* Liberibacter americanus' em *Diaphorina citri* Kuwayama. 85 p. Dissertação de Mestrado (Entomologia) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' - ESALQ/USP, Piracicaba, São Paulo.

NAVA, D. E., TORRES, M. L. G., RODRIGUES, M. D. L., BENTO, J. M. S., PARRA, J. R. P. (2007). Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. *Journal of Applied Entomology*, 131(9-10), 709–715.

PAIVA, P.E.B., YAMAMOTO, P.T. (2019) Análises de sobrevivência de imaturos de *Diaphorina citri* em pomar jovem de citros em São Paulo, Brasil. *Arq. Inst. Biol.* (86) São Paulo.

PELZ-STELINSKI, K.S.; BRLANSKY, R.H.; EBERT, T.A.; ROGERS, M.E. (2010). Transmission Parameters for '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' by Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Psyllidae). *J. Econ. Entomol.*, 103: 1531-1541.

RAIOL-JUNIOR, L.L.; CIFUENTES-ARENAS, J.C.; CARVALHO, E.V.; GIRARDI, E.A.; LOPES, A.S. (2021). Evidence That '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' Moves Predominantly Toward New Tissue Growth in Citrus Plants. *Plant Dis.*, 105: 34-42.

PIETERSEN, G.; ARREBOLA, E.; BREYTENBACH, J.H.J.; KORSTEN, L.; LE ROUX, H.F.; LA GRANGE, H.; LOPES, S.A.; MEYER, J.B.; PRETORIUS, M.C.; SCHWERDTFEGER, M.; VAN VUUREN, S.P.; YAMAMOTO, P. (2010). Survey for '*Candidatus* Liberibacter' species in South Africa confirms the presence of only '*Ca. L. africanus*' in commercial citrus. *Plant Dis.*, 94: 244-249.

TEIXEIRA, D.C.; DANET, J.L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E.C.; JESUS, JR. M.C.; YAMAMOTO, P.T.; LOPES, S.A.; BASSANEZI, R.B.; AYRES, A.J.; SAILLARD, C., BOVÉ, J.M. (2005). Citrus Huanglongbing in São Paulo State,

Brazil: PCR detection of the “*Candidatus*” *Liberibacter* species associated with the disease. *Mol. Cell. Probes*, 19: 173-179.

TEIXEIRA, D.C.; COLETTE, S.; CAROLE, C.; MARTINS, E.C.; WULFF, N.A.; EVEILLARD-JAGOUÉIX, S.; YAMAMOTO, P.T.; AYRES, A.J.; BOVÉ, J.M. (2008). Distribution and quantification of *Candidatus* *Liberibacter americanus*, agent of Huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brazil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. *Mol. Cel. Probes*, 22: 139-150.

TEIXEIRA, D.C.; WULFF, N.A.; LOPES, S.A.; YAMAMOTO, P.T.; MIRANDA, M.P.; SPOSITO, M.B.; JUNIOR, J.B.; BASSANEZI, R.B. (2010). Characterization and etiology of the bacteria associated with Huanglongbing. *Citrus Research & Technology*, 31:115-128.

UKUDA-HOSOKAWA, R, SADOYAMA, Y, KISHABA M, KURIWADA, T., ANBUTSU H., FUKATSU, T. (2015). Infection Density Dynamics of the Citrus Greening Bacterium “*Candidatus* *Liberibacter asiaticus*” in Field Populations of the Psyllid *Diaphorina citri* and Its Relevance to the Efficiency of Pathogen Transmission to Citrus Plants. *Appl Environ Microbiol.* 81(11):3728-36.

WULFF, N.A.; DANIEL, B.; SASSI, R.S.; MOREIRA, A.S.; BASSANEZI, R.B.; SALA, I.; COLETTI, D.A.B.; RODRIGUES, J. (2020). Incidence of *Diaphorina citri* Carrying *Candidatus* *Liberibacter asiaticus* in Brazil’s Citrus Belt. *Insects*, 11: 672.

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. 2014. The complete genome sequence of *Candidatus* *Liberibacter americanus*, associated with Citrus Huanglongbing. *Molecular Plant Microbe Interactions* 27 (2): 163-176.

XU, C.F.; XIA, Y.H.; LI, K.B.; KE, C. (1988). Further study of the transmission of citrus Huanglongbing by a psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama. In: International Organization of Citrus Virologists (IOCV), 10th Conference Proceedings, 1988. Riverside, CA, 243-248 p.

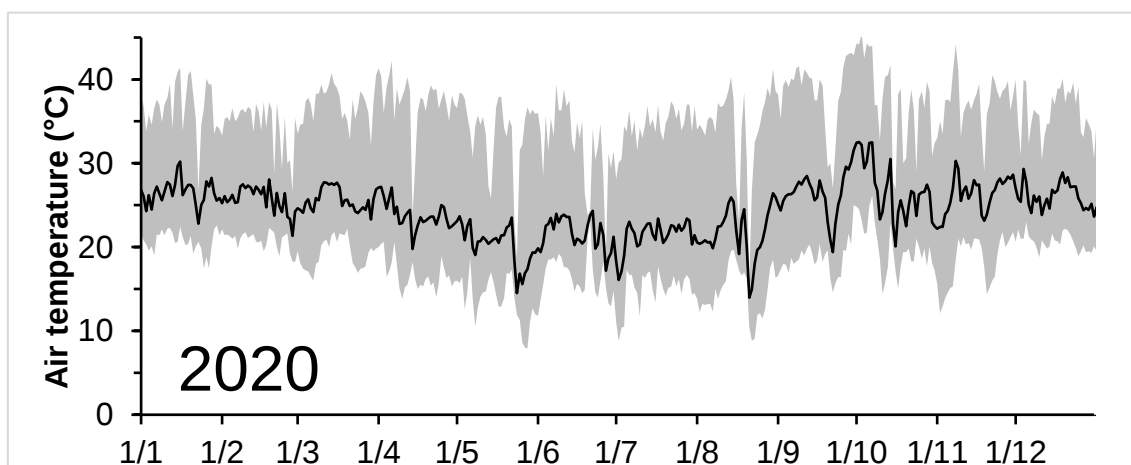
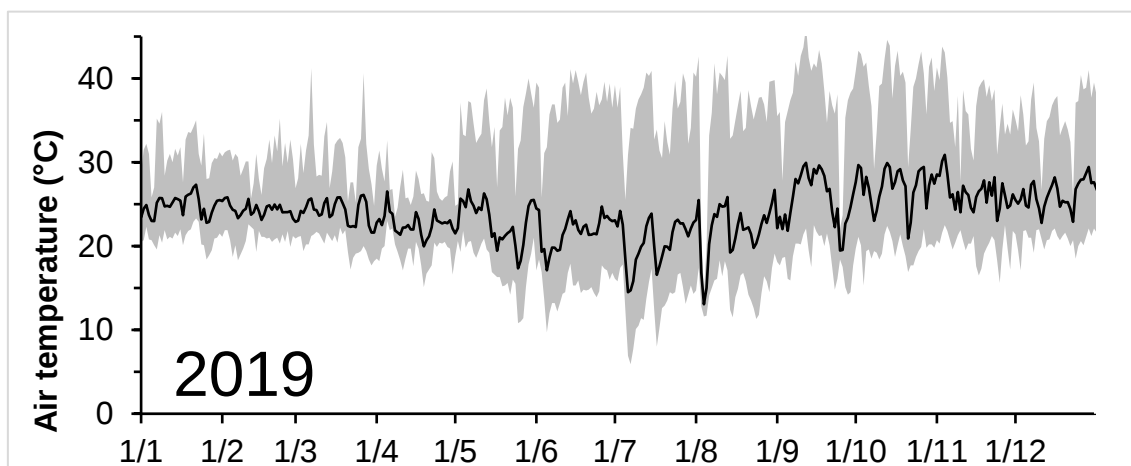
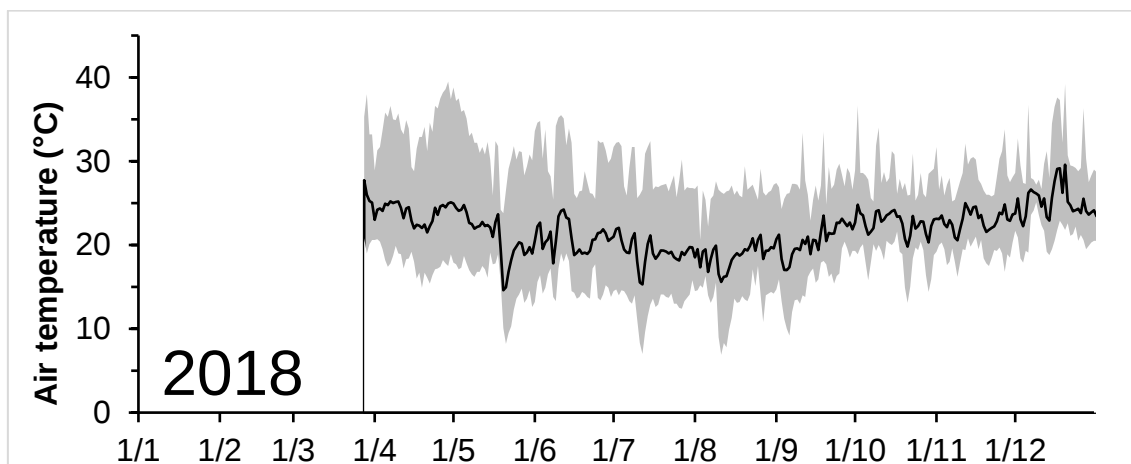
YAMAMOTO, P.T.; PAIVA, P.E.B.; GRAVENA, S. (2001). Flutuação populacional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em pomares de citros na região norte do estado de São Paulo. *Neotrop. Entomol.*, 30: 165-170.

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 *Proc. Int. Huanglongbing-Greening Workshop* (p.p. 96). University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

ZORZENON, F.P.F., TOMASETO, A.F., DAUGHERTY M.P., LOPES J.R.S., MIRANDA, M.P. (2020). Factors associated with *Diaphorina citri* immigration into commercial citrus orchards in São Paulo State, Brazil. J Appl Entomol. 00:1–10.

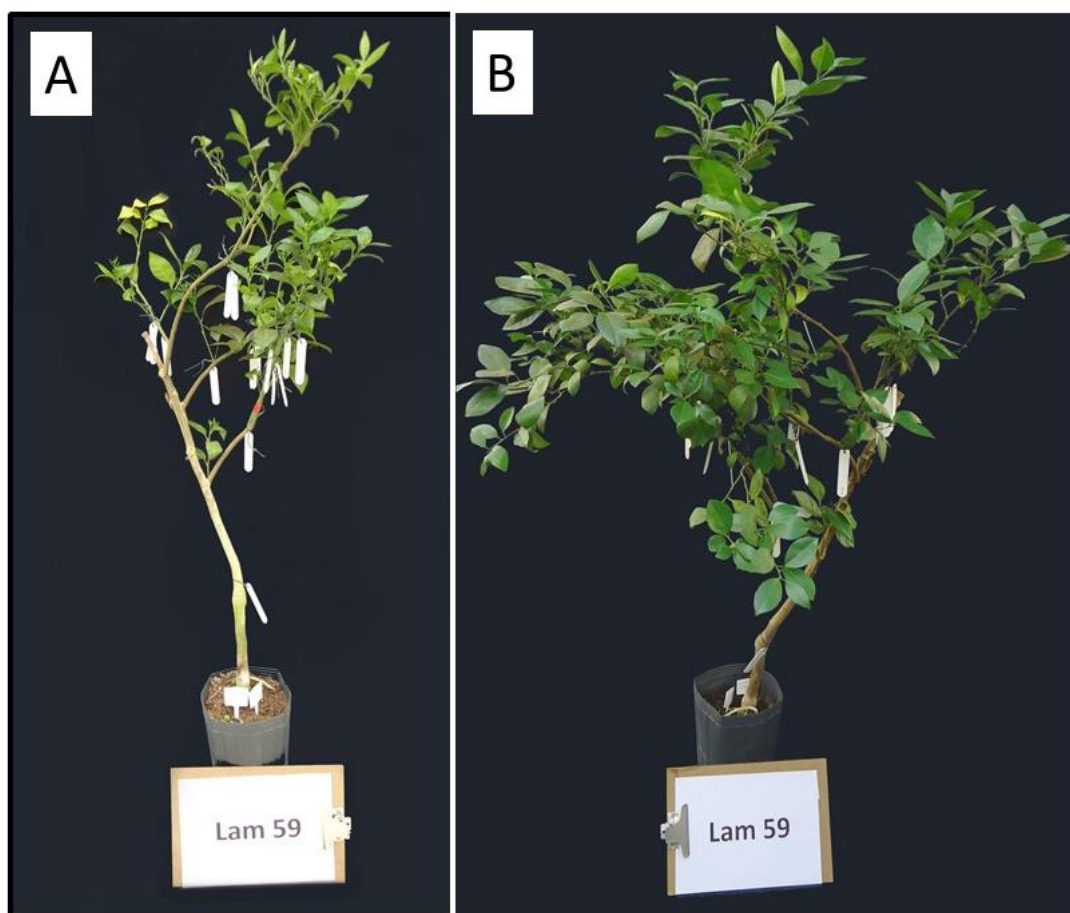
APÊNDICES

APÊNDICE A. Temperaturas média, máxima e mínima registras em casa de vegetação durante a condução dos experimentos de coinfecção de Laranjeiras doce (I e II).



(Fonte: o autor)

APÊNDICE B. Planta coinfectada com predominância de *Candidatus* *Liberibacter americanus* aos 6 meses (A) e predominância de *Candidatus* *Liberibacter asiaticus* aos 24 meses (B).



(Fonte: o autor)