

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Desafio de plantas transgênicas de laranja ‘Hamlin’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck)
superexpressando os genes *CDR-1* ou *PDF2.2* ou *GLT1* à infecção com
Xanthomonas citri subsp. *citri* ou *Candidatus Liberibacter asiaticus*

Michael Willian Rocha de Souza

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2023

Michael Willian Rocha de Souza
Engenheiro Agrônomo

Desafio de plantas transgênicas de laranja 'Hamlin' (*Citrus sinensis* L. Osbeck)
superexpressando os genes *CDR-1* ou *PDF2.2* ou *GLT1* à infecção com *Xanthomonas citri*
subsp. *citri* ou *Candidatus Liberibacter asiaticus*

Orientador:
Prof. Dr. **FRANCISCO DE ASSIS ALVES MOURÃO FILHO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2023

RESUMO

Desafio de plantas transgênicas de laranja 'Hamlin' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) superexpressando os genes *CDR-1* ou *PDF2.2* ou *GLT1* à infecção com *Xanthomonas citri* subsp. *citri* ou *Candidatus Liberibacter asiaticus*

A citricultura está sujeita a distintos desafios, em especial, à ameaça de diversas doenças de alto impacto destrutivo, a exemplo do cancro cítrico (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) (*Xcc*) e do Greening ou Huanglongbing (*Candidatus Liberibacter* spp.) (HLB). A engenharia genética de plantas cítricas é uma abordagem atraente na busca de materiais superiores, pois, pode resultar em um rápido desenvolvimento de cultivares resistentes a doenças. Dessa forma, plantas de laranja 'Hamlin' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) previamente transformadas para a superexpressão do gene *CDR-1* (*constitutive disease resistance protein 1*) ou *PDF2.2* (*pathogenesis-related proteins 12*) ou *GLT1* (*plastidic glucose transporter 1*), foram avaliadas para potenciais efeitos de resistência à *Xcc* ou HLB. Dezesete eventos *CDR-1* foram multiplicados a partir de borbulhas de plantas matrizes em porta-enxertos de limão 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck) e inoculados por aspersão com uma suspensão de *Xcc*. Nenhum evento transgênico apresentou reduções na incidência e severidade dos sintomas de cancro cítrico em comparação com as plantas não transgênicas (WT1), 35 dias após a inoculação. Entretanto, no primeiro bioensaio, a incidência e a severidade da doença foram maiores em alguns eventos superexpressando o gene *CDR-1*. Supõe-se que a reação de resposta de hipersensibilidade (HR) que envolve uma necrose rápida de células infectadas e a formação de lesões pode ter sido potencializada pela superexpressão deste gene, e ter contribuído para a colonização de *Xcc*. Embora nenhum dos eventos *CDR-1* ou *PDF2.2* tenham apresentado menor incidência ou severidade quando comparados com as plantas não transgênicas, é possível que as menores populações bacterianas, número e área média de lesões, além de maiores teores de H₂O₂ e clorofila em alguns materiais possam auxiliar no manejo da doença em áreas de exclusão ou erradicação. Em outro experimento, dez eventos superexpressando o gene *GLT1* foram inoculados com borbulhas infectadas com CLas, bactéria associada ao HLB. A infecção com CLas acarretou na elevação das concentrações de glicose, frutose e de amido em plantas não transgênicas (WT). Embora nenhum dos eventos *GLT1* apresente características de resistência ao HLB quando comparados com as plantas WT, é possível que os menores valores de Ciclo *threshold* (CT) e populações bacterianas, associados também a menores concentrações de açúcares solúveis, bons parâmetros para trocas gasosas e macro e micronutrientes em alguns eventos, possam contribuir para um melhor desenvolvimento das plantas infectadas.

Palavras-chave: Biotecnologia, Citricultura, Doenças bacterianas, Transformação genética

ABSTRACT

Evaluation of transgenic sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) overexpressing the *CDR-1*, *PDF2.2*, or *GLT1* gene for resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* or *Candidatus Liberibacter asiaticus*

Citriculture is subject to different challenges, in particular, the threat of various diseases with a highly destructive impact, such as citrus canker (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) (*Xcc*) and Greening or Huanglongbing (*Candidatus Liberibacter* spp.) (HLB). Genetic engineering of citrus plants is an attractive approach in the search for superior materials, as it can result in the rapid development of disease-resistant cultivars. Thus, plants of 'Hamlin' orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) previously transformed for overexpression of the gene *CDR-1* (*constitutive disease resistance protein 1*) or *PDF2.2* (*pathogenesis-related proteins 12*) or *GLT1* (*plastidic glucose transporter 1*), were evaluated for potential effects of resistance to *Xcc* or HLB. Seventeen *CDR-1* events were multiplied from buds of parent plants on 'Rangpur' lemon rootstocks (*C. limonia* Osbeck) and inoculated by spraying with an *Xcc* suspension. No transgenic event showed reductions in the incidence and severity of citrus canker symptoms compared to non-transgenic plants (WT1) 35 days after inoculation. However, in the first bioassay, the incidence and severity of the disease were higher in some events overexpressing the *CDR-1* gene. It is hypothesized that the hypersensitivity response (HR) reaction, which involves rapid necrosis of infected cells and the formation of lesions, may have been potentiated by the overexpression of this gene, and have contributed to the colonization of *Xcc*. Although none of the *CDR-1* or *PDF2.2* events showed lower incidence or severity when compared to non-transgenic plants, it is possible that lower bacterial populations, average number and area of lesions, in addition to higher H₂O₂ and chlorophyll contents in some materials can help in the management of the disease in areas of exclusion or eradication. In another experiment, ten events overexpressing the *GLT1* gene were inoculated with buds infected with CLAs, bacteria associated with HLB. Infection with CLAs led to increased concentrations of glucose, fructose, and starch in non-transgenic (WT) plants. Although none of the *GLT1* events show characteristics of resistance to HLB when compared to WT plants, it is possible that the lower Cycle threshold (CT) values and bacterial populations, also associated with lower concentrations of soluble sugars, are good parameters for gas exchange and macro and micronutrients in some events, may contribute to better development of infected plants.

Keywords: Biotechnology, Citrus growing, Bacterial diseases, Genetic transformation

INTRODUÇÃO GERAL

As plantas cítricas são cultivadas em mais de 140 países abrangendo os climas tropicais, subtropicais e mediterrâneos (Zhong e Nicolosi, 2020), com grande destaque dentro do agronegócio brasileiro, movimentando mais de US\$ 6,5 bilhões, anualmente (Neves e Trombin, 2017). China, Brasil, Índia, México, Espanha e Estados Unidos da América produzem mais de dois terços das frutas cítricas do mundo (Kesbiç et al., 2022). A laranja é a fruta mais cultivada dentre as frutas cítricas em geral, com cerca de 50-60% da produção total. No entanto, outras espécies, tais como o limão, lima e tangerina também possuem importância comercial (Satari e Karimi, 2018). O Brasil é o maior produtor mundial de suco de laranja (FAO, 2021), com a maior concentração de pomares no cinturão citrícola do estado de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro. Segundo o Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS, 2022), a área reservada para a produção de laranjas no cinturão citrícola é de 344.389 mil hectares, contando com cerca de 170 milhões de árvores produtoras que devem gerar 317 milhões de caixas (de 40,8 kg) na safra de 2022/2023. Embora o principal objetivo da indústria de processamento de cítricos seja o suco, outros produtos são explorados, a exemplo de óleos essenciais, polpa seca, geleias, aromatizantes para bebidas e pectina (Zema et al., 2018).

Apesar da posição de destaque, a citricultura brasileira está sujeita a distintos desafios em todas as principais regiões produtoras. A cultura sofre constantemente o ataque de pragas e doenças, as quais prejudicam a produtividade dos pomares e a qualidade das frutas (Urbaneja et al., 2020; Syed-Ab-Rahman, Hesamian e Prasad, 2022). As principais doenças bacterianas nos cultivos comerciais são o cancro cítrico, causado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) (Martins et al., 2020), e o Greening ou Huanglongbing (HLB), que está associado a espécies de *Candidatus Liberibacter* spp. (da Graça et al., 2016).

No Brasil, a primeira constatação do cancro cítrico ocorreu em 1957, na região de Presidente Prudente - SP, disseminando-se para outras áreas do país (Leite Junior et al., 1987). Atualmente, a doença está presente em diversas áreas de cultivo, e os sintomas podem ser observados em todas as partes aéreas da planta. Caracterizam-se, principalmente, pela formação de pústulas salientes e corticosas na superfície das folhas, frutos e galhos. Desfolha e queda de frutos também são

observados como resposta da planta à infecção (de Carvalho et al., 2015; Martins et al., 2020).

A disseminação de *Xcc* ocorre, principalmente, através do vento e da chuva, e quando em contato com a superfície foliar, cresce na forma de biofilmes estruturados que são essenciais, não apenas para proteger as células dos estresses ambientais, mas também para estabelecer o processo de infecção através de estômatos, hidatódios, lenticelas ou por injúrias causadas por insetos e ferramentas usadas nos pomares (Behlau e Belasque Júnior, 2014; Picchi et al., 2016). A *Xcc* é capaz de sobreviver em restos vegetais por até dois meses, o que pode servir como fonte de inóculo bacteriano (Graham et al., 2004).

Várias medidas de manejo são adotadas na tentativa de controlar ou até mesmo erradicar o cancro cítrico, incluindo podas de árvores infectadas, tratamento pós-colheita de frutos, descontaminação de equipamentos e pessoal. Em regiões endêmicas, realizam-se pulverizações de produtos químicos para proteger folhas e frutos jovens. Além disso, utilizam-se de medidas adicionais de controle que envolvem o plantio de quebra-ventos nos pomares, o controle da larva minadora [*Phyllocnistis citrella* (Stainton, 1856) (Lepidoptera: Gracillariidae)] e a produção de mudas cítricas saudáveis (Behlau et al., 2010; de Carvalho et al., 2015). As pulverizações utilizam produtos à base de cobre que são altamente tóxicos para patógenos bacterianos e com longos períodos residuais, características que levaram ao seu uso generalizado (Leite Jr e Mohan, 1990; Cha e Cooksey, 1991). Entretanto, essa é uma prática preventiva, sem atividade curativa ou sistêmica (Gottwald et al., 2002). Além disso, tais abordagens representam um alto custo ambiental e financeiro, pela aplicação de moléculas químicas no meio ambiente e a erradicação de plantas contaminadas.

Atualmente, o cancro cítrico está presente em 24,70% dos talhões de laranja do parque citrícola paulista e triângulo mineiro, número que corresponde a 37,41 milhões árvores contaminadas (FUNDECITRUS, 2022). Devido às inúmeras tentativas desafiadoras de combate ao cancro cítrico, vários esforços têm sido realizados para entender os mecanismos de interação planta-patógeno e as bases moleculares do desenvolvimento da doença, com o objetivo de estabelecer medidas mais eficazes de controle (Ferrasa et al., 2020; Long et al., 2021).

O HLB é considerado uma das doenças mais devastadoras que ameaçam a citricultura mundial, sendo causada por bactérias não cultiváveis *in vitro* e limitadas

ao floema (Bové, 2006; Pustika et al., 2008). O HLB foi confirmado em 51 dos 140 países produtores de citros (Wang, 2019). Desde que foi detectada pela primeira vez no Brasil, em março de 2004, e na Flórida em agosto de 2005 (Teixeira et al., 2005; Halbert et al., 2012), esta doença se espalhou rapidamente para todas as regiões citrícolas nas Américas.

Três espécies bacterianas relacionadas ao HLB foram identificadas e nomeadas, sendo elas: *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Ca. Liberibacter africanus* (CLaf) e *Ca. Liberibacter americanus* (CLam) (Lopes et al., 2009). Segundo Albrecht e Bowman (2012), CLas é a mais agressiva e difundida entre as regiões. A transmissão pode ocorrer pela propagação de material contaminado ou por espécies de psílídeos, como o *Diaphorina citri* (Kuwayama, 1908) (Hemiptera: Lividae), vetor da doença no Brasil e na Ásia (Bové, 2006), e o *Trioza erytreae* (Del Guercio, 1918) (Hemiptera: Triozidae), vetor na África (da Graça et al., 2016). Os sintomas do HLB incluem obstrução e colapso dos elementos de tubo crivado, acúmulo de amido, manchas e amarelecimento das folhas que atravessam as nervuras (mosqueados), árvores atrofiadas, frutos tortos, pequenos e com sabor amargo e também, a queda de folhas e frutos (Etxeberria et al., 2009; Dagulo et al., 2010; Wang et al., 2017). A infecção grave eventualmente resulta na morte de árvores (Hodges e Spreen, 2012). Acredita-se que o acúmulo excessivo de amido cause danos aos cloroplastos, produzindo as manchas amareladas (Bové, 2006; Etxeberria et al., 2009), podendo afetar negativamente a fotossíntese, distorcendo as membranas do tilacóide e interferindo na absorção de luz (Pirone et al., 2005).

Diversas espécies comerciais do gênero *Citrus* são afetadas pela doença, com diferentes níveis de suscetibilidade, não sendo reportada nenhuma resistência. Ainda, com a inexistência de procedimentos curativos para o HLB, a prevenção da infecção tem sido essencial no controle da doença em pomares comerciais (Belasque Junior et al., 2009). Tem-se recomendado a identificação e erradicação das plantas infectadas, reduzindo-se, desta forma, as fontes de inóculo nos pomares, aquisição de mudas saudáveis e a utilização de inseticidas para o controle do inseto vetor (Iftikhar et al., 2016; Belasque Jr et al., 2017). Uma solução econômica e ambientalmente sustentável para conviver com o HLB seria a disponibilidade de cultivares tolerantes ou resistentes.

O melhoramento genético de citros pode ser limitado por condições biológicas associadas à incompatibilidade sexual e esterilidade, longo período juvenil e custos

elevados para conservação das progênes até a maturidade, o que leva a uma baixa possibilidade de aquisição e identificação de indivíduos superiores. Além disso, a baixa variabilidade genética entre as espécies do gênero *Citrus*, determinada pela estreita origem genética, impede o avanço do melhoramento genético através de técnicas clássicas (Grosser e Gmitter, 1990; Nicolosi et al., 2000; Machado et al., 2005).

A engenharia genética de plantas cítricas é uma abordagem atraente entre os melhoristas, pois, pode resultar em um rápido desenvolvimento de cultivares resistentes às doenças (Sun et al., 2019). Genes envolvidos na expressão de proteínas relacionadas à patogênese (PR), proteínas indutoras da resistência sistêmica adquirida (SAR) e proteínas antibacterianas de origem vegetal ou não vegetal, entre outros, podem ser utilizadas conjuntamente com ferramentas biotecnológicas para o melhoramento de citros (Mendes et al., 2010; Wally e Punja, 2010; Dutt et al., 2015; Tavano et al., 2015; Hao, Zhang e Stover, 2017).

Os genes *constitutive disease resistance protein 1* (*CDR-1*), relacionado a um sistema de sinal de peptídeos envolvidos na indução de respostas de defesa locais e sistêmicas, o gene *pathogenesis-related proteins 12* (*PDF2.2*), da família das defensinas vegetais, e o gene *plastidic glucose transporter 1* (*GLT1*), envolvido na exportação de fotoassimilados e no transporte de produtos da degradação de amido, apresentam potencial para a proteção de plantas cítricas contra *Xcc* e CLas.

Dessa forma, plantas de laranja 'Hamlin' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) previamente transformadas para a superexpressão do gene *CDR-1* ou *PDF2.2* ou *GLT1*, foram avaliadas para potenciais efeitos de resistência à *Xcc* ou CLas.

REFERÊNCIAS

- Albrecht, U., & Bowman, K. D. (2012). Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Plant Science*, 185, 118-130.
- Behlau, F., Amorim, L., Belasque Jr, J., Bergamin Filho, A., Leite Jr, R. P., Graham, J. H., & Gottwald, T. R. (2010). Annual and polyetic progression of citrus canker on trees protected with copper sprays. *Plant Pathology*, 59(6), 1031-1036.
- Behlau, F., & Belasque Júnior, J. (2014). Cancro cítrico: a doença e seu controle. Belasque Junior, J., Bergamin Filho, A., Bassanezi, R. B., Barbosa, J. C., Fernandes, N. G., Yamamoto, P. T., ... & Massari, C. A. (2009). Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. *Tropical Plant Pathology*, 34, 137-145.
- Belasque Jr, J., Yamamoto, P. T., de Miranda, M. P., Bassanezi, R. B., Ayres, A. J., & Bové, J. M. (2017). Controle do huanglongbing no estado de São Paulo, Brasil. *Citrus Research & Technology*, 31(1), 53-64.
- Bové, J. M. (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88(1), 7-37.
- Cha, J. S., & Cooksey, D. A. (1991). Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(20), 8915-8919.
- da Graça, J. V., Douhan, G. W., Halbert, S. E., Keremane, M. L., Lee, R. F., Vidalakis, G., & Zhao, H. (2016). Huanglongbing: An overview of a complex pathosystem ravaging the world's citrus. *Journal of Integrative Plant Biology*, 58(4), 373-387.

Dagulo, L., Danyluk, M. D., Spann, T. M., Valim, M. F., Goodrich-Schneider, R., Sims, C., & Rouseff, R. (2010). Chemical characterization of orange juice from trees infected with citrus greening (Huanglongbing). *Journal of Food Science*, 75(2), C199-C207.

de Carvalho, S. A., de Carvalho Nunes, W. M., Belasque Jr, J., Machado, M. A., Croce-Filho, J., Bock, C. H., & Abdo, Z. (2015). Comparison of resistance to asiatic citrus canker among different genotypes of citrus in a long-term canker-resistance field screening experiment in Brazil. *Plant Disease*, 99(2), 207-218.

Dutt, M., Barthe, G., Irey, M., & Grosser, J. (2015). Transgenic citrus expressing an Arabidopsis NPR1 gene exhibit enhanced resistance against Huanglongbing (HLB; Citrus Greening). *PloS One*, 10(9), e0137134.

Etteberria, E., Gonzalez, P., Achor, D., & Albrigo, G. (2009). Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected Valencia orange trees. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74(1), 76-83.

Ferrasa, A., Murata, M. M., Cofre, T. D., Cavallini, J. S., Peron, G., Julião, M. H., ... & Ferro, J. A. (2020). CitrusKB: a comprehensive knowledge base for transcriptome and interactome of *Citrus* spp. infected by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* at different infection stages. Database, 2020.

Food and Agriculture Organization - FAO. Citrus fruit statistical compendium 2020. (2021). Rome. Disponível em: <<https://www.fao.org/3/cb6492en/cb6492en.pdf>>. acesso em: 15 ago. 2022.

Fundo de Defesa da Citricultura (). Levantamento da incidência das doenças dos citros: greening, CVC e cancro cítrico. (2022). Araraquara, SP: Fundecitrus, 75. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/pdf/levantamentos/Levantamento%20de%20doencas%202022_Relatorio%20completo.pdf> acesso em: 07 fev. 2023.

Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS). Sumario executivo – estimativa da safra de laranja 2022/2023 do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste mineiro. (2022). Araraquara, SP: Fundecitrus. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/2022_05_26_Sumario_Executivo_da_Estimativa_da_Safra_de_Laranja_2022-2023.pdf> acesso em: 15 ago. 2022.

Gottwald, T. R., Graham, J. H., & Schubert, T. S. (2002). Citrus canker: the pathogen and its impact. *Plant Health Progress*, 3(1), 15.

Graham, J. H., Gottwald, T. R., Cubero, J., & Achor, D. S. (2004). *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Molecular Plant Pathology*, 5(1), 1-15.

Grosser, J. W., & Gmitter Jr, F. G. (1990). Protoplast fusion and citrus improvement. *Plant breeding reviews*, 8, 339-374.

Halbert, S. E., Manjunath, K., Ramadugu, C., & Lee, R. F. (2012). Incidence of huanglongbing-associated ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) collected from plants for sale in Florida. *Florida Entomologist*, 95(3), 617-624.

Hao, G., Zhang, S., & Stover, E. (2017). Transgenic expression of antimicrobial peptide D2A21 confers resistance to diseases incited by *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* and *Xanthomonas citri*, but not *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Plos One*, 12(10), e0186810.

Hodges, A. W., & Spreen, T. H. (2012). Economic impacts of citrus greening (HLB) in Florida, 2006/07–2010/11. *EDIS*, 2012(1).

Iftikhar, Y., Rauf, S., Shahzad, U., & Zahid, M. A. (2016). Huanglongbing: Pathogen detection system for integrated disease management—A review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 15(1), 1-11.

Kesbiç, O. S., Acar, Ü., Mohammady, E. Y., Salem, S. M., Ragaza, J. A., El-Haroun, E., & Hassaan, M. S. (2022). The beneficial effects of citrus peel waste and its extract on fish performance and health status: A review. *Aquaculture Research*, 53(12), 4217-4232.

Leite Jr, R. P., & Mohan, S. K. (1990). Integrated management of the citrus bacterial canker disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the State of Paraná, Brazil. *Crop Protection*, 9(1), 3-7.

Leite Junior, R. P., Mohan, S. K., Pereira, A. L. G., & Campacci, C. A. (1987). Integrated control of citrus canker-effect of genetic resistance and application of bactericides. *Fitopatologia Brasileira* (Brazil).

Long, Q., Du, M., Long, J., Xie, Y., Zhang, J., Xu, L., ... & Zou, X. (2021). Transcription factor WRKY22 regulates canker susceptibility in sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) by enhancing cell enlargement and CsLOB1 expression. *Horticulture Research*, 8.

Lopes, S. A., Bertolini, E., Frare, G. F., Martins, E. C., Wulff, N. A., Teixeira, D. C., Fernandes, N. G., Cambra, M. (2009). Graft transmission efficiencies and multiplication of '*Candidatus* Liberibacter americanus' and '*Ca.* Liberibacter asiaticus' in citrus plants. *Phytopathology*, 99(3), 301-6.

Machado, M. A., Cristofani, M., Amaral, A. D., & Oliveira, A. C. (2005). Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. *Citros*, 222-277.

Martins, P. M. M., de Oliveira Andrade, M., Benedetti, C. E., & de Souza, A. A. (2020). *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: host interaction and control strategies. *Tropical Plant Pathology*, 45(3), 213-236.

Mendes, B. M. J., Cardoso, S. C., Boscarinol-Camargo, R. L., Cruz, R. B., Mourão Filho, F. A. A., & Bergamin Filho, A. (2010). Reduction in susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* expressing the rice Xa21 gene. *Plant Pathology*, 59(1), 68-75.

Neves, M. F., & Trombin, V. G. (2017). Anuário da citricultura 2017. São Paulo: CitrusBR, 28, 24.

Nicolosi, E., Deng, Z. N., Gentile, A., La Malfa, S., Continella, G., & Tribulato, E. (2000). Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(8), 1155-1166.

Picchi, S. C., Takita, M. A., Coletta-Filho, H. D., Machado, M. A., & de Souza, A. A. (2016). N-acetylcysteine interferes with the biofilm formation, motility and epiphytic behaviour of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Plant Pathology*, 65(4), 561-569.

Pirone, C. L., Alexander, L. C., & Lamp, W. O. (2005). Patterns of starch accumulation in alfalfa subsequent to potato leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) injury. *Environmental Entomology*, 34(1), 199-204.

Pustika, A. B., Subandiyah, S., Holford, P., Beattie, G. A. C., Iwanami, T., & Masaoka, Y. (2008). Interactions between plant nutrition and symptom expression in mandarin trees infected with the disease huanglongbing. *Australasian Plant Disease Notes*, 3(1), 112-115.

Satari, B., & Karimi, K. (2018). Citrus processing wastes: Environmental impacts, recent advances, and future perspectives in total valorization. *Resources, Conservation and Recycling*, 129, 153-167.

Sun, L., Ke, F., Nie, Z., Wang, P., & Xu, J. (2019). Citrus genetic engineering for disease resistance: Past, present and future. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 5256.

Syed-Ab-Rahman, S. F., Hesamian, M. H., & Prasad, M. (2022). Citrus disease detection and classification using end-to-end anchor-based deep learning model. *Applied Intelligence*, 52(1), 927-938.

Tavano, E. D. R., Vieira, M. L. C., Alves-Mourão Filho, F. D. A., Harakava, R., & Mendes, B. M. J. (2015). Genetic transformation of *Citrus sinensis* 'Hamlin' with attacin A driven by a phloem tissue-specific promoter for resistance to *Candidatus Liberibacter* spp. *Acta Horticulturae*, (1065), 695-701.

Texeira, D. D. C., Ayres, J., Kitajima, E. W., Danet, L., Jagoueix-Eveillard, S., Saillard, C., & Bové, J. M. (2005). First report of a huanglongbing-like disease of citrus in São Paulo State, Brazil and association of a new *Liberibacter* species, '*Candidatus Liberibacter americanus*', with the disease. *Plant Disease*, 89(1), 107-107.

Urbaneja, A., Grout, T. G., Gravena, S., Wu, F., Cen, Y., & Stansly, P. A. (2020). Citrus pests in a global world. In *The Genus Citrus* (pp. 333-348). Woodhead Publishing.

Wally, O., & Punja, Z. K. (2010). Genetic engineering for increasing fungal and bacterial disease resistance in crop plants. *GM Crops*, 1(4), 199-206.

Wang, N., Pierson, E. A., Setubal, J. C., Xu, J., Levy, J. G., Zhang, Y., ... & Martins Jr, J. (2017). The *Candidatus Liberibacter*-host interface: insights into pathogenesis mechanisms and disease control. *Annual Review of Phytopathology*, 55, 451-482.

Wang, N. (2019). The citrus huanglongbing crisis and potential solutions. *Molecular Plant*, 12(5), 607-609.

Zema, D. A., Calabrò, P. S., Folino, A., Tamburino, V. I. N. C. E. N. Z. O., Zappia, G., & Zimbone, S. M. (2018). Valorisation of citrus processing waste: A review. *Waste Management*, 80, 252-273.

Zhong, G., & Nicolosi, E. (2020). Citrus origin, diffusion, and economic importance. In *The Citrus Genome* (pp. 5-21). Springer, Cham.

CAPÍTULO 1: REAÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE LARANJA 'HAMLIN' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) SUPEREXPRESSANDO OS GENES *CDR-1* OU *PDF2.2* À INFECÇÃO COM *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Resumo

O agronegócio citrícola enfrenta grandes perdas econômicas devido o ataque de pragas e doenças. O cancro cítrico, causado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*), é uma das doenças economicamente mais prejudiciais às cultivares de laranja doce em todo o mundo. Até o momento, não são conhecidas medidas fitossanitárias eficazes para erradicação da doença. Por outro lado, o uso da biotecnologia para o desenvolvimento de plantas transgênicas que expressem proteínas indutoras da resistência sistêmica adquirida (SAR) pode conferir resistência de amplo espectro a patógenos. Dessa forma, os genes *constitutive disease resistance protein 1* (*CDR-1*), relacionado a um sistema de sinal de peptídeos envolvidos na indução de respostas de defesa locais e sistêmicas, e o gene *pathogenesis-related proteins 12* (*PDF2.2*), da família das defensinas vegetais, foram previamente utilizados para a transformação genética de plantas de laranja 'Hamlin' (*Citrus sinensis* L. Osbeck), visando resistência a *Xcc*. Dezesete eventos foram então multiplicados a partir de borbulhas de plantas matrizes em porta-enxertos de limão 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck) e inoculados por aspersão com uma suspensão de *Xcc*. Nenhum evento transgênico apresentou reduções na incidência e severidade dos sintomas de cancro cítrico em comparação com as plantas não transgênicas (WT1), 35 dias após a inoculação, nos três bioensaios realizados. Entretanto, no primeiro bioensaio, a incidência e a severidade da doença foram maiores em alguns eventos superexpressando o gene *CDR-1*. Buscando uma compreensão para a maior incidência e severidade de cancro, evidenciada nos eventos 1 e 5B (*CDR-1*), estes foram selecionados e, posteriormente, analisados em inoculações de *Xcc* por ferimentos. Considerando o gene *PDF2.2*, os eventos H1, H4, H5 e H9A foram selecionados para os bioensaios de inoculações por ferimentos. Supõe-se que a reação de resposta de hipersensibilidade (HR) que envolve uma necrose rápida de células infectadas e a formação de lesões, pode ter sido potencializada pela superexpressão do gene *CDR-1* e ter contribuído para a colonização do cancro cítrico. Embora nenhum dos eventos *CDR-1* ou *PDF2.2* tenham apresentado menor incidência ou severidade quando comparados com as plantas não transgênicas, é possível que as menores populações bacterianas, número e área média de lesões, além de maiores teores de H₂O₂ e clorofila em alguns materiais, possam auxiliar no manejo da doença em áreas de exclusão ou erradicação, levando também, a uma redução significativa nos custos de controle da doença.

Palavras-chave: Biotecnologia, Citricultura, Cancro cítrico

CHAPTER 1: TRANSGENIC SWEET ORANGE (*Citrus sinensis* L. OSBECK) OVEREXPRESSING THE *CDR-1* OR *PDF2.2* GENE AND THEIR INITIAL EVALUATION FOR RESISTANCE TO

Xanthomonas citri subsp. *citri*

Abstract

Citrus agribusiness faces major economic losses due to pests and diseases. Citrus canker, caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*), is one of the most economically harmful diseases of sweet orange cultivars worldwide. So far, there are no known effective phytosanitary measures to eradicate the disease. On the other hand, the use of biotechnology to develop transgenic plants that express systemic acquired resistance (SAR) inducing proteins can confer broad-spectrum resistance to pathogens. Thus, the *constitutive disease resistance protein 1* (*CDR-1*) genes, related to a peptide signal system involved in the induction of local and systemic defense responses, and the *pathogenesis-related proteins 12* (*PDF2.2*) gene, from a family of plant defensins, were previously used for the genetic transformation of 'Hamlin' orange plants (*Citrus sinensis* L. Osbeck), aiming at resistance to *Xcc*. Seventeen events were then multiplied from buds of mother plants on 'Rangpur' lemon rootstocks (*C. limonia* Osbeck) and inoculated by spraying with a suspension of *Xcc*. No transgenic event showed reductions in the incidence and severity of citrus canker symptoms compared to non-transgenic plants (WT1), 35 days after inoculation, in the three bioassays performed. However, in the first bioassay, the incidence and severity of the disease were higher in some events overexpressing the *CDR-1* gene. Seeking an understanding of the higher incidence and severity of canker, evidenced in events 1 and 5B (*CDR-1*), these were selected and subsequently analyzed in *Xcc* inoculations by wounds. Considering the *PDF2.2* gene, events H1, H4, H5, and H9A were selected for wound inoculation bioassays. It is hypothesized that the hypersensitivity response (HR) reaction, which involves rapid necrosis of infected cells and the formation of lesions, may have been potentiated by overexpression of the *CDR-1* gene and have contributed to the colonization of citrus canker. Although none of the *CDR-1* or *PDF2.2* events showed lower incidence or severity when compared to non-transgenic plants, it is possible that lower bacterial populations, average number and area of lesions, in addition to higher H₂O₂ and chlorophyll contents in some materials, can help in the management of the disease in areas of exclusion or eradication, also leading to a significant reduction in the costs of controlling the disease.

Keywords: Biotechnology; Citrus agribusiness; Citrus canker

1. Introdução

As frutas cítricas são amplamente cultivadas em todo o mundo, representando uma importante atividade econômica. Entre os principais produtores, citam-se Brasil, China, Estados Unidos da América e México (Spreen et al., 2020), sendo o Brasil o maior produtor de laranja doce, respondendo por mais de três quartos das exportações globais de suco de laranja concentrado (Neves et al.,

2020). Embora o principal objetivo da indústria de processamento de cítricos seja o suco de laranja, outros produtos são explorados, tais como óleos essenciais, polpa seca, geleias, aromatizantes para bebidas e pectina (Zema et al., 2018).

O agronegócio citrícola enfrenta grandes perdas econômicas devido ao ataque de pragas e doenças (Bouvet et al., 2019; Poveda et al., 2021). O cancro cítrico, causado pela bactéria Gram-negativa *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc), é uma das doenças economicamente mais prejudiciais das variedades comerciais de citros em todo o mundo (FERENCE et al., 2018). Os sintomas são observados em toda a parte aérea da planta, caracterizando-se, inicialmente, como pontos escurecidos e posterior formação de pústulas salientes e corticosas (Martins et al., 2020). Desfolha e queda de frutos também são observados como resposta da planta à infecção (de Carvalho et al., 2015). Atualmente, o cancro cítrico está presente em 24,70% dos talhões de laranja do parque citrícola paulista e triângulo mineiro, número que corresponde a 37,41 milhões árvores contaminadas (FUNDECITRUS, 2022). Até o momento, não são conhecidas medidas fitossanitárias para erradicação da doença (Caserta et al., 2019); no entanto, medidas de controle podem ser empregadas na tentativa de atenuar sua gravidade e disseminação. A retirada de árvores infectadas, uso de quebra-ventos, pulverizações com produtos à base de cobre e outros produtos químicos para proteger folhas e frutos e descontaminação de equipamentos e pessoal, são algumas das abordagens realizadas (Ferrasa et al., 2020). Porém, estas abordagens representam um alto custo financeiro e ambiental, pela aplicação de moléculas químicas no meio ambiente e a erradicação de plantas contaminadas.

Durante o ataque de um patógeno, no local da infecção, uma ampla gama de sinais é gerada e enviada através do sistema vascular, comunicando aos tecidos não infectados da planta sobre um perigo potencial. Em resposta, um sistema de defesa é acionado através da resistência sistêmica adquirida (SAR), associada a altos níveis de ácido salicílico (SA), ácido abscísico (ABA), ácido jasmônico (JA), reforços da parede celular, síntese de compostos antimicrobianos e de proteínas relacionadas à patogênese (PR) (Durrant e Dong, 2004; Prasad et al., 2009; Soares et al., 2020). Com base nas características bioquímicas, as proteínas PR diferem amplamente umas das outras e, atualmente, são agrupadas em 17 famílias, como as antifúngicas (PR1), 1,3-glucanases (PR2), inibidoras de proteinase (PR6),

peroxidases (PR9), e das defensinas vegetais (PR12) (Sels et al., 2008; Ali et al., 2018).

O melhoramento genético de citros pode ser limitado por complexidades biológicas, tais como, incompatibilidade sexual, esterilidade, longo período juvenil e baixa variabilidade genética (Grosser e Gmitter, 1990; Nicolosi et al., 2000; Gottwald et al., 2002), e na tentativa de sobrepor essas barreiras, enfoques biotecnológicos são empregados para reduzir os custos de produção e apoiar o manejo das doenças cítricas (Goulin et al., 2019). Nesse contexto, genes relacionados à possível aquisição de resistência ao cancro cítrico devem ser fatores-chave no processo de melhoramento para a produção de variedades transgênicas (Singh e Rajam, 2009).

O uso da biotecnologia para o desenvolvimento de plantas transgênicas que expressam proteínas indutoras de SAR pode conferir resistência de amplo espectro a patógenos. Avaliando a expressão diferencial de genes em plantas infectadas com patógenos (Sels et al., 2008; Prasad et al., 2009; Albrecht e Bowman, 2012; Bowman e Albrecht, 2015), os genes *constitutive disease resistance protein 1* (*CDR-1*), relacionado a um sistema de sinal de peptídeos envolvidos na indução de respostas de defesa locais e sistêmicas (Xia et al., 2004), e o gene *pathogenesis-related proteins 12* (*PDF2.2*), da família das defensinas vegetais, foram identificados e utilizados para a transformação genética de plantas de laranja 'Hamlin' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) em trabalhos anteriores. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar as plantas de laranja doce surperexpressando o gene *CDR-1* ou *PDF2.2* para potenciais efeitos de resistência à *Xcc*.

5. Conclusão

Embora nenhum dos eventos *CDR-1* ou *PDF2.2* tenham apresentado menor incidência ou severidade quando comparados com as plantas não transgênicas, é possível que as menores populações bacterianas, número e área média de lesões, além de maiores teores de H₂O₂ e clorofila em alguns materiais, possam auxiliar no manejo do cancro cítrico em áreas de exclusão ou erradicação, levando também, a uma redução significativa nos custos de controle da doença.

REFERÊNCIAS

- Al Amin, G. M., Kong, K., Sharmin, R. A., Kong, J., Bhat, J. A., & Zhao, T. (2019). Characterization and rapid gene-mapping of leaf lesion mimic phenotype of spl-1 mutant in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2193.
- Albrecht, U., & Bowman, K. D. (2012). Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Plant Science*, 185, 118-130.
- Alexieva, V.; Sergiev, I.; Mapelli, S.; Karanov, E. (2001). The effect of drought and ultravioleta radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment*, 24(12), 1337-1344.
- Alfano, J. R., & Collmer, A. (1996). Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. *The Plant Cell*, 8(10), 1683.
- Ali, S., Ganai, B. A., Kamili, A. N., Bhat, A. A., Mir, Z. A., Bhat, J. A., ... & Grover, A. (2018). Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological Research*, 212, 29-37.
- Ansante, N. F. (2015). Transformação genética de tomate Micro-Tom e de laranja doce com os genes *chitinase type III (PR-8)* e *constitutive disease resistance protein (CDR-1)* de *Citrus sinensis*. (Dissertation, Universidade de São Paulo).
- Arshad, M., Ullah, M. I., Qureshi, J. A., & Afzal, M. (2018). Physiological effects of citrus leafminer *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae) larval feeding on photosynthetic and gaseous exchange rates in citrus. *Journal of Economic Entomology*, 111(5), 2264-2271.
- Ayres, P. G. (1981). Responses of stomata to pathogenic microorganisms. *Stomatal Physiology*, 205-221.

Behlau, F., Canteros, B. I., Minsavage, G. V., Jones, J. B., & Graham, J. H. (2011). Molecular characterization of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(12), 4089-4096.

Behlau, F., Scandelai, L. H. M., da Silva Junior, G. J., & Lanza, F. E. (2017). Soluble and insoluble copper formulations and metallic copper rate for control of citrus canker on sweet orange trees. *Crop Protection*, 94, 185-191.

Belasque Jr, J., Gasparoto, M. C. G., & Marcassa, L. G. (2008). Detection of mechanical and disease stresses in citrus plants by fluorescence spectroscopy. *Applied Optics*, 47(11), 1922-1926.

Belasque Jr, J. (2005). Dinâmica espacial do cancro cítrico, interação com a larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*) e diversidade genética do seu agente causal (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*). (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

Bem, B. P. D., Bogo, A., Brighenti, A. F., Wruz, D. A., Allebrandt, R., Stefanini, M., & Rufato, L. (2020). Dinâmica temporal do míldio da videira em variedades Piwi na região de San Michele all'Adige, Trentino-Itália. *Summa Phytopathologica*, 46, 212-220.

Bouvet, J. P. R., Urbaneja, A., Pérez-Hedo, M., & Monzó, C. (2019). Contribution of predation to the biological control of a key herbivorous pest in citrus agroecosystems. *Journal of Animal Ecology*, 88(6), 915-926.

Box, G. E., & Cox, D. R. (1964). An analysis of transformations. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 26(2), 211-243.

Bowman, K. D., & Albrecht, U. (2015). Comparison of gene expression changes in susceptible, tolerant and resistant hosts in response to infection with Citrus tristeza virus and huanglongbing. *Journal of Citrus Pathology*, 2(1).

Broekaert, W. F., Cammue, B. P., De Bolle, M. F., Thevissen, K., De Samblanx, G. W., Osborn, R. W., & Nielson, K. (1997). Antimicrobial peptides from plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 16(3), 297-323.

Broekaert, W. F., Terras, F. R., Cammue, B. P., & Osborn, R. W. (1995). Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant physiology*, 108(4), 1353.

Caserta, R., Teixeira-Silva, N. S., Granato, L. M., Dorta, S. O., Rodrigues, C. M., Mitre, L. K., ... & De Souza, A. A. (2019). Citrus biotechnology: What has been done to improve disease resistance in such an important crop?. *Biotechnology Research and Innovation*, 3, 95-109.

Coll, N. S., Epple, P., & Dangl, J. L. (2011). Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death & Differentiation*, 18(8), 1247-1256.

Dangl, J. L., Dietrich, R. A., & Richberg, M. H. (1996). Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *The Plant Cell*, 8(10), 1793.

Darolt, J. C., Fassini, C. G., Wulff, N. A., & Di Piero, R. M. (2020). 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*, 45(6), 691-700.

Daungfu, O., Youpensuk, S., & Lumyong, S. (2019). Endophytic bacteria isolated from citrus plants for biological control of citrus canker in lime plants. *Tropical Life Sciences Research*, 30(1), 73.

de Carvalho, S. A., de Carvalho Nunes, W. M., Belasque Jr, J., Machado, M. A., Croce-Filho, J., Bock, C. H., & Abdo, Z. (2015). Comparison of resistance to asiatic citrus canker among different genotypes of citrus in a long-term canker-resistance field screening experiment in Brazil. *Plant Disease*, 99(2), 207-218.

de Mello, F. E., Zaniboni, C., Barreto, T., da Silva, M. R., & Leite Júnior, R. P. (2020). Soil application of acibenzolar-s-methyl and thiamethoxam for the management of citrus canker under subtropical conditions. *Tropical Plant Pathology*, 45(6), 684-690.

de Oliveira Carvalho, A., & Gomes, V. M. (2009). Plant defensins—prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides*, 30(5), 1007-1020.

Dietrich, R. A., Delaney, T. P., Uknes, S. J., Ward, E. R., Ryals, J. A., & Dangl, J. L. (1994). *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell*, 77(4), 565-577.

Dixon, R. A., & Lamb, C. J. (1990). Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41, 339-367.

Durrant, W. E., & Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 42, 185-209.

Fan, J., He, Z., Ma, L. Q., & Stoffella, P. J. (2011). Accumulation and availability of copper in citrus grove soils as affected by fungicide application. *Journal of Soils and Sediments*, 11(4), 639-648.

Farrell, G. M., Preece, T. F., & Wren, M. J. (1969). Effects of infection by *Phytophthora injestans* (Mont.) de Bary on the stomata of potato leaves. *Annals of Applied Biology*, 63(2), 265-275.

Ference, C. M., Gochez, A. M., Behlau, F., Wang, N., Graham, J. H., & Jones, J. B. (2018). Recent advances in the understanding of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* pathogenesis and citrus canker disease management. *Molecular Plant Pathology*, 19(6), 1302.

Ferrasa, A., Murata, M. M., Cofre, T. D., Cavallini, J. S., Peron, G., Julião, M. H., ... & Ferro, J. A. (2020). CitrusKB: a comprehensive knowledge base for transcriptome

and interactome of *Citrus* spp. infected by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* at different infection stages. Database, 2020.

Fundo de Defesa da Citricultura (). Levantamento da incidência das doenças dos citros: greening, CVC e cancro cítrico. (2022). Araraquara, SP: Fundecitrus, 75. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/pdf/levantamentos/Levantamento%20de%20doençass%202022_Relatorio%20completo.pdf> acesso em: 07 fev. 2023.

Glazebrook, J. (2001). Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis - 2001 status. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(4), 301-308.

Glazebrook, J., Rogers, E. E., & Ausubel, F. M. (1997). Use of Arabidopsis for genetic dissection of plant defense responses. *Annual Review of Genetics*, 31(1), 547-569.

Gottwald, T. R., Sun, X., Riley, T., Graham, J. H., Ferrandino, F., & Taylor, E. L. (2002). Geo-referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida. *Phytopathology*, 92(4), 361-377.

Goulin, E. H., Galdeano, D. M., Granato, L. M., Matsumura, E. E., Dalio, R. J. D., & Machado, M. A. (2019). RNA interference and CRISPR: Promising approaches to better understand and control citrus pathogens. *Microbiological Research*, 226, 1-9.

Govrin, E. M., & Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current biology*, 10(13), 751-757.

Graham, J. H., & Myers, M. E. (2011). Soil application of SAR inducers imidacloprid, thiamethoxam, and acibenzolar-S-methyl for citrus canker control in young grapefruit trees. *Plant Disease*, 95(6), 725-728.

Greenberg, J. T., & Ausubel, F. M. (1993). Arabidopsis mutants compromised for the control of cellular damage during pathogenesis and aging. *The Plant Journal*, 4(2), 327-341.

Greenberg, J. T., Guo, A., Klessig, D. F., & Ausubel, F. M. (1994). Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell*, 77(4), 551-563.

Grosser, J. W., & Gmitter Jr, F. G. (1990). Protoplast fusion and citrus improvement. *Plant Breed Reviews*, 8, 339-374.

Guimaraes, R. L., & Stotz, H. U. (2004). Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. *Plant physiology*, 136(3), 3703-3711.

Hanks, J. N., Snyder, A. K., Graham, M. A., Shah, R. K., Blaylock, L. A., Harrison, M. J., & Shah, D. M. (2005). Defensin gene family in *Medicago truncatula*: structure, expression and induction by signal molecules. *Plant Molecular Biology*, 58(3), 385-399.

Jiang, M., HE, C. M., MIAO, L. X., & ZHANG, Y. C. (2012). Overexpression of a broccoli defensin gene *BoDFN* enhances downy mildew resistance. *Journal of Integrative Agriculture*, 11(7), 1137-1144.

Kanzaki, H., Nirasawa, S., Saitoh, H., Ito, M., Nishihara, M., Terauchi, R., & Nakamura, I. (2002). Overexpression of the wasabi defensin gene confers enhanced resistance to blast fungus (*Magnaporthe grisea*) in transgenic rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 105(6), 809-814.

Kumar, N., Ebel, R. C., & Roberts, P. D. (2011). Superoxide dismutase activity in kumquat leaves infected with *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 86(1), 62-68.

Lam, E. (2004). Controlled cell death, plant survival and development. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 5(4), 305-315.

Lay, F. T., & Anderson, M. A. (2005). Defensins-components of the innate immune system in plants. *Current Protein and Peptide Science*, 6(1), 85-101.

Lindenthal, M., Steiner, U., Dehne, H. W., & Oerke, E. C. (2005). Effect of downy mildew development on transpiration of cucumber leaves visualized by digital infrared thermography. *Phytopathology*, 95(3), 233-240.

Li, Q., Qin, X., Qi, J., Dou, W., Dunand, C., Chen, S., & He, Y. (2020). CsPrx25, a class III peroxidase in *Citrus sinensis*, confers resistance to citrus bacterial canker through the maintenance of ROS homeostasis and cell wall lignification. *Horticulture research*, 7.

Mafra, V., Kubo, K. S., Alves-Ferreira, M., Ribeiro-Alves, M., Stuart, R. M., Boava, L. P., ... & Machado, M. A. (2012). Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. *PloS one*, 7(2), e31263.

Maitra, N., & Cushman, J. C. (1998). Characterization of a drought-induced soybean cDNA encoding a plant defensin (Accession N^o. U12150) (PGR98-213). *Plant Physiol*, 118, 1536.

Mansfield, J. W. (1986). Recognition, elicitors and the hypersensitive reaction. In *Recognition in microbe-plant symbiotic and pathogenic interactions* (pp. 433-437). Springer, Berlin, Heidelberg.

Martins, P. M. M., de Oliveira Andrade, M., Benedetti, C. E., & de Souza, A. A. (2020). *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: host interaction and control strategies. *Tropical Plant Pathology*, 45(3), 213-236.

Ma, W., Pang, Z., Huang, X., Xu, J., Pandey, S. S., Li, J., ... & Wang, N. (2022). Citrus Huanglongbing is a pathogen-triggered immune disease that can be mitigated with antioxidants and gibberellin. *Nature Communications*, 13(1), 529.

Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., & He, S. Y. (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*, 126(5), 969-980.

Mu, X., Li, J., Dai, Z., Xu, L., Fan, T., Jing, T., ... & Gou, M. (2021). Commonly and Specifically Activated Defense Responses in Maize Disease Lesion Mimic Mutants Revealed by Integrated Transcriptomics and Metabolomics Analysis. *Frontiers in Plant Science*, 12, 690.

Neves, M. F., Trombin, V. G., Marques, V. N., & Martinez, L. F. (2020). Global orange juice market: a 16-year summary and opportunities for creating value. *Tropical Plant Pathology*, 45, 166-174.

Nicolosi, E., Deng, Z. N., Gentile, A., La Malfa, S., Continella, G., & Tribulato, E. (2000). Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(8), 1155-1166.

Olivares, J. E., Díaz-Camino, C., Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Rodríguez-Kessler, M., Zamudio, F. Z., ... & Sánchez, F. (2011). Nodulin 41, a novel late nodulin of common bean with peptidase activity. *BMC Plant Biology*, 11(1), 1-14.

Pelegri, P. B., & Franco, O. L. (2005). Plant γ -thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(11), 2239-2253.

Peters, L. P., Carvalho, G., Vilhena, M. B., Creste, S., Azevedo, R. A., & Monteiro-Vitorello, C. B. (2017). Functional analysis of oxidative burst in sugarcane smut-resistant and-susceptible genotypes. *Planta*, 245(4), 749-764.

Pitino, M., Armstrong, C. M., & Duan, Y. (2015). Rapid screening for citrus canker resistance employing pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity responses. *Horticulture Research*, 2.

Poveda, J., Roeschlin, R. A., Marano, M. R., & Favaro, M. A. (2021). Microorganisms as biocontrol agents against bacterial citrus diseases. *Biological Control*, 158, 104602.

Prasad, B. D., Creissen, G., Lamb, C., & Chattoo, B. B. (2009). Overexpression of rice (*Oryza sativa* L.) OsCDR1 leads to constitutive activation of defense responses in rice and *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(12), 1635-1644.

Rasoulnia, A., Alavi, S. M., Askari, H., Farrokhi, N., & Soltani Najafabadi, M. (2018). Effects of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Infection on Chlorophyll Pigment Content,

Chlorophyll Fluorescence and Proteins Change in *Citrus aurantifolia*. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 20(3), 571-582.

Rawat, N., Kumar, B., Albrecht, U., Du, D., Huang, M., Yu, Q., ... & Deng, Z. (2017). Genome resequencing and transcriptome profiling reveal structural diversity and expression patterns of constitutive disease resistance genes in Huanglongbing-tolerant *Poncirus trifoliata* and its hybrids. *Horticulture Research*, 4.

Rios, V. S., Rios, J. A., Aucique-Pérez, C. E., Silveira, P. R., Barros, A. V., & Rodrigues, F. Á. (2018). Leaf gas exchange and chlorophyll a fluorescence in soybean leaves infected by *Phakopsora pachyrhizi*. *Journal of Phytopathology*, 166(2), 75-85.

Sagaram, U. S., Pandurangi, R., Kaur, J., Smith, T. J., & Shah, D. M. (2011). Structure-activity determinants in antifungal plant defensins MsDef1 and MtDef4 with different modes of action against *Fusarium graminearum*. *PLoS One*, 6(4), e18550.

Selitreffnikoff, C. P. (2001). Antifungal proteins. *Applied and environmental microbiology*, 67(7), 2883-2894.

Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B.M., Cammue, B.P., De Bolle, M.F. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol. Biochem.* 46, 941–950.

Seo, H. H., Park, S., Park, S., Oh, B. J., Back, K., Han, O., ... & Kim, Y. S. (2014). Overexpression of a defensin enhances resistance to a fruit-specific anthracnose fungus in pepper. *PloS One*, 9(5), e97936.

Shaner, G., & Finney, R. E. (1977). The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology*, 67(8), 1051-1056.

Singh, S., & Rajam, M. V. (2009). Citrus biotechnology: Achievements, limitations and future directions. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 15(1), 3-22.

Soares, J. M., Tanwir, S. E., Grosser, J. W., & Dutt, M. (2020). Development of genetically modified citrus plants for the control of citrus canker and huanglongbing. *Tropical Plant Pathology*, 45(3), 237-250.

Spreen, T. H., Gao, Z., Fernandes Jr, W., & Zansler, M. L. (2020). Global economics and marketing of citrus products. In *The Genus Citrus* (pp. 471-493). Woodhead Publishing.

Suárez-Acevedo, S., Chaves-Bedoya, G., Guariz-Pinheiro, D., Cristina-Lopes, A., Mari-Murata, M., Hirochi-Herai, R., ... & Rodas-Mendoza, E. (2022). Comparative transcriptional analyzes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* reveal mechanisms of adaptation and bacterial virulence in the early stage of citrus canker disease. *European Journal of Plant Pathology*, 1-16.

Sun, L., Ke, F., Nie, Z., Wang, P., & Xu, J. (2019). Citrus genetic engineering for disease resistance: Past, present and future. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 5256.

Syvertsen, J. P., & Garcia-Sanchez, F. (2014). Multiple abiotic stresses occurring with salinity stress in citrus. *Environmental and Experimental Botany*, 103, 128-137.

Takahashi, A., Kawasaki, T., Wong, H. L., Suharsono, U., Hirano, H., & Shimamoto, K. (2003). Hyperphosphorylation of a mitochondrial protein, prohibitin, is induced by calyculin A in a rice lesion-mimic mutant *CDR1*. *Plant Physiology*, 132(4), 1861-1869.

Terras, F. R., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N. V., Osborn, R. W., Kester, A., ... & Vanderleyden, J. (1995). Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *The Plant Cell*, 7(5), 573-588.

Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., & Collinge, D. B. (1997). Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction. *The Plant Journal*, 11(6), 1187-1194.

Torres, M. A. (2010). ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum*, 138(4), 414-429.

Van der Weerden, N. L., & Anderson, M. A. (2013). Plant defensins: common fold, multiple functions. *Fungal Biology Reviews*, 26(4), 121-131.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 3(7), 1-12.

Van Loon, L. C., & Van Strien, E. A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55(2), 85-97.

Walton, J. D. (1996). Host-selective toxins: agents of compatibility. *The Plant Cell*, 8(10), 1723.

Weymann, K., Hunt, M., Uknes, S., Neuenschwander, U., Lawton, K., Steiner, H. Y., & Ryals, J. (1995). Suppression and restoration of lesion formation in *Arabidopsis* *Isd* mutants. *The Plant Cell*, 7(12), 2013-2022.

Williams, G. T., Smith, C. A., McCarthy, N. J., & Grimes, E. A. (1992). Apoptosis: final control point in cell biology. *Trends in Cell Biology*, 2(9), 263-267.

Xia, Y., Suzuki, H., Borevitz, J., Blount, J., Guo, Z., Patel, K., Dixon, R. A., & Lamb, C. (2004). An extracellular aspartic protease functions in *Arabidopsis* disease resistance signaling. *The EMBO Journal*, 23(4), 980-988.

Ying, X., Redfern, B., Gmitter Jr, F. G., & Deng, Z. (2020). Heterologous expression of the Constitutive Disease Resistance 2 and 8 Genes from *Poncirus trifoliata* restored the hypersensitive response and resistance of *Arabidopsis cdr1* mutant to bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plants*, 9(7), 821.

Zema, D. A., Calabrò, P. S., Folino, A., Tamburino, V. I. N. C. E. N. Z. O., Zappia, G., & Zimbone, S. M. (2018). Valorisation of citrus processing waste: A review. *Waste Management*, 80, 252-273.

CAPÍTULO 2: REAÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE LARANJA ‘HAMLIN’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck) SUPEREXPRESSANDO O GENE *GLT1* À INFECÇÃO COM *Candidatus Liberibacter asiaticus*

Resumo

O Greening ou Huanglongbing (HLB) afeta a maioria das espécies cítricas, embora diferentes respostas à infecção podem ser observadas entre genótipos e espécies do gênero *Citrus*. Híbridos tolerantes ao HLB apresentam maiores transcrições para o gene *plastidic glucose transporter 1 (GLT1)*, quando comparado com plantas suscetíveis. Os altos níveis de expressão para este gene podem ser parte do motivo pelo qual este genótipo não apresenta os sintomas distintos da doença. Dessa forma, plantas de laranja ‘Hamlin’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck) previamente transformadas geneticamente para a superexpressão do gene *GLT1* foram avaliadas quanto à potencial resistência ao HLB. Dez eventos foram multiplicados a partir de borbulhas de plantas matrizes em porta-enxertos de limão ‘Cravo’ (*C. limonia* Osbeck) e inoculados com borbulhas infectadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), bactéria associada ao HLB. A infecção por CLas elevou as concentrações de glicose, frutose e de amido em plantas não transgênicas (WT). O evento transgênico 79 se destacou por apresentar altos valores de Ciclo *threshold* (CT), o que, provavelmente, desencadeou reduções em todos os níveis de açúcares solúveis, de amido e maior transpiração e teor de clorofila b aos três meses após a inoculação, diferentemente do evento 35, com baixo CT, alto teor de glicose, amido e redução de clorofila b. As plantas não transgênicas e sadias demonstraram maiores taxas de assimilação líquida de CO₂ (A), que foram associadas a maiores valores de déficit de pressão de vapor (VpdL), condutância estomática (Gs) e transpiração (E), indicando que o HLB pode comprometer as trocas gasosas. De forma geral, as variáveis E, VpdL e teor de clorofila b foram maiores em alguns eventos transgênicos, mas não demonstrando valores que poderiam indicar resistência. Embora nenhum dos eventos *GLT1* apresente características de resistência ao HLB quando comparados com as plantas WT, é possível que os menores valores de CT e populações bacterianas, associados também a menores concentrações de açúcares solúveis, bons parâmetros para trocas gasosas e macro e micronutrientes em alguns eventos, possam contribuir para um melhor desenvolvimento das plantas infectadas.

Palavras-chave: Biotecnologia; Citricultura; greening; HLB; transgênico

CHAPTER 2: REACTION OF TRANSGENIC 'HAMLIN' ORANGE PLANTS (*Citrus sinensis* L. OSBECK) OVEREXPRESSING THE *GLT1* GENE TO INFECTION WITH *Candidatus Liberibacter asiaticus*

Abstract

Greening or Huanglongbing (HLB) affects most citrus species, although different responses to infection can be observed among genotypes and species of the genus *Citrus*. HLB-tolerant hybrids have higher transcriptions for the *plastidic glucose transporter 1 (GLT1)* gene when compared to susceptible plants. The high levels of expression for this gene may be part of the reason why this genotype does not show distinct symptoms of the disease. Thus, plants of 'Hamlin' orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) previously genetically transformed for overexpression of the *GLT1* gene were evaluated for potential resistance to HLB. Ten events were multiplied from buds of parent plants on 'Rangpur' lemon rootstocks (*C. limonia* Osbeck) and inoculated with buds infected with *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs), a bacterium associated with HLB. CLAs infection increased glucose, fructose, and starch concentrations in non-transgenic (WT) plants. The transgenic event 79 stood out for presenting high Cycle threshold (CT) values, which probably triggered reductions in all levels of soluble sugars, starch, and higher transpiration and chlorophyll b content three months after inoculation, unlike event 35, with low CT, high glucose, starch, and reduced chlorophyll b. Non-transgenic and healthy plants showed higher rates of CO₂ assimilation (A), which were associated with higher values of vapor pressure deficit (VpdL), stomatal conductance (Gs), and transpiration (E), indicating that HLB can compromise gas exchange. In general, the variables E, VpdL, and chlorophyll b content were higher in some transgenic events, but not demonstrating values that could indicate resistance. Although none of the *GLT1* events show characteristics of resistance to HLB when compared to WT plants, it is possible that the lower CT values and bacterial populations, also associated with lower concentrations of soluble sugars, are good parameters for gas exchange and macro and micronutrients in some events, may contribute to better development of infected plants.

1. Introdução

A citricultura mundial enfrenta um cenário de prejuízos econômicos devido a incidência do Greening ou Huanglongbing (HLB), considerada a doença mais devastadora entre as culturas cítricas. O HLB foi confirmado em 51 dos 140 países produtores de citros (Wang, 2019), tornando-se uma séria ameaça, principalmente, para o Brasil e os Estados Unidos da América (EUA), os maiores produtores de laranja doce e suco concentrado. No Brasil, o primeiro relato da doença ocorreu em 2004, na região de Araraquara - SP (Coletta-Filho et al., 2004; Texeira et al., 2005), e sem nenhuma cura disponível, cerca de 8,5 milhões de árvores foram erradicadas somente em 2020 (FUNDECITRUS, 2022). Nos EUA, desde sua detecção em 2005,

estima-se que o HLB tenha infectado mais de 95% dos pomares comerciais do estado Flórida (Li et al., 2019).

A doença está associada a espécies não cultivadas de α -proteobactérias Gram-negativas e restritas às células do floema (Bové, 2006). As três espécies relacionadas ao HLB foram nomeadas de acordo com o continente em que foram inicialmente identificadas, sendo elas: *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Ca. Liberibacter africanus* (CLaf) e *Ca. Liberibacter americanus* (CLam) (Lopes et al., 2009). A transmissão pode ocorrer pela propagação de material contaminado ou por espécies de psílídeos, como o *Diaphorina citri* (Kuwayama, 1908) (Hemiptera: Liviidae), vetor da doença no Brasil e Ásia (Bové, 2006), e o *Trioza erytreae* (Del Guercio, 1918) (Hemiptera: Triozidae), vetor na África (da Graça et al., 2016).

Os sintomas típicos da doença incluem altura reduzida, nervuras foliares grossas, escuras e encurtadas, obstrução e colapso dos elementos de tubo crivado, acúmulo de amido e o inchaço das lamelas médias da parede celular (Achor et al., 2010; Wang et al., 2017). Acredita-se que o acúmulo excessivo de amido cause danos aos cloroplastos, produzindo manchas amareladas nas folhas (mosqueados) (Bové, 2006; Etxeberria et al., 2009), podendo afetar diretamente a fotossíntese distorcendo as membranas do tilacóide e interferindo na absorção de luz (Pirone et al., 2005). À medida que a doença progride, os frutos tornam-se menores, parcialmente verdes e eventualmente, as árvores infectadas morrem (Ying et al., 2020).

O HLB afeta a maioria das espécies cítricas, embora diferentes respostas à infecção podem ser observadas entre genótipos e espécies do gênero *Citrus* (Folimonova et al., 2009). Estudos transcricionais à infecção por CLas são realizados para a descoberta de genes-chave e o entendimento dos mecanismos de tolerância (Albrecht e Bowman, 2012; Mafra et al., 2013). A obtenção de plantas resistentes ao HLB através do melhoramento convencional é dificultada por condições biológicas associadas à incompatibilidade sexual, esterilidade, baixa variabilidade genética, longo período juvenil e custos elevados para conservação das progênes até a maturidade (Grosser e Gmitter, 1990; Nicolosi et al., 2000; Gottwald et al., 2002) como também, à indisponibilidade de espécies cítricas resistentes na natureza (Song et al., 2017). Portanto, diversos grupos de pesquisa têm utilizado ferramentas biotecnológicas para o desenvolvimento de plantas que aumentem a resposta de defesa contra *C. Liberibacter* spp. de forma efetiva (Rocha

Tavano et al., 2015; Zou et al., 2017; Peng et al., 2021; Zou et al., 2021; Longhi et al., 2022).

Em um estudo de Albrecht e Bowman (2012), o híbrido trifoliado 'US-897' (*Citrus reticulata* Blanco × *Poncirus trifoliata* L. Raf.), tolerante ao HLB, teve maior taxa de transcrição para o gene *plastidic glucose transporter 1* (*GLT1*), quando comparado com plantas suscetíveis de tangerina 'Cleopatra' (*C. reticulata* Blanco). Em *Arabidopsis*, este gene está envolvido na exportação de fotoassimilados dos cloroplastos e desempenha um papel essencial no transporte de produtos da degradação de amido, crescimento e desenvolvimento de plantas (Cho et al., 2011). Os altos níveis de expressão para este gene podem ser parte do motivo pelo qual este genótipo, como outros trifoliatas e híbridos de trifoliata, não apresentam os sintomas distintos da doença associados ao acúmulo de amido normalmente observado em plantas sensíveis ao HLB (Albrecht e Bowman, 2012).

A superexpressão do gene *GLT1* pode ser uma estratégia para remediar os efeitos negativos do HLB na citricultura. Dessa forma, plantas de laranja 'Hamlin' (*C. sinensis* L. Osbeck), previamente transformadas geneticamente com o gene *GLT1*, foram avaliadas para potenciais efeitos de resistência ao HLB.

5. Conclusão

Embora nenhum dos eventos *GLT1* tenha apresentado evidências de resistência ao HLB quando comparados com as plantas não transgênicas, é possível que os menores valores de CT e populações bacterianas, associados também a menores concentrações de açúcares solúveis, bons parâmetros para trocas gasosas e macro e micronutrientes em alguns eventos, possam contribuir para um melhor desenvolvimento das plantas em áreas drasticamente afetadas pela doença.

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. *Plant Pathology Journal*, 9(2), 56-64.

Albrecht, U., & Bowman, K. D. (2008). Gene expression in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck following infection with the bacterial pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* causing Huanglongbing in Florida. *Plant Science*, 175(3), 291-306.

Albrecht, U., & Bowman, K. D. (2012). Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Plant Science*, 185, 118-130.

Albrecht, U., Fiehn, O., & Bowman, K. D. (2016). Metabolic variations in different citrus rootstock cultivars associated with different responses to Huanglongbing. *Plant Physiology and Biochemistry*, 107, 33-44.

Amaral, L. I. V. D., Gaspar, M., Costa, P. M. F., Aidar, M. P. M., & Buckeridge, M. S. (2007). A new rapid and sensitive enzymatic method for extraction and quantification of starch in plant material. *Hoehnea*, 34(4), 425-431.

Arenque, B. C., Grandis, A., Pocius, O., de Souza, A. P., & Buckeridge, M. S. (2014). Responses of *Senna reticulata*, a legume tree from the Amazonian floodplains, to elevated atmospheric CO₂ concentration and waterlogging. *Trees*, 28(4), 1021-1034.

Baker, N. R., & Rosenqvist, E. (2004). Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany*, 55(403), 1607-1621.

Björkman, O., & Powles, S. B. (1984). Inhibition of photosynthetic reactions under water stress: interaction with light level. *Planta*, 161(6), 490-504.

Bové, J. M. (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88(1), 7-37.

Cai, Q., Liu, C., Yuan, M., Pan, L., Yang, Q., & Zhou, L. (2022). HLB induce changes in the tree physiology of citron (*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 28(2), 517-531.

Cakmak, I., & Kirkby, E. A. (2008). Role of magnesium in carbon partitioning and alleviating photooxidative damage. *Physiologia Plantarum*, 133(4), 692-704.

Cakmak, I., & Yazici, A. M. (2010). Magnesium: a forgotten element in crop production. *Better Crops*, 94(2), 23-25.

Cen, H., Weng, H., Yao, J., He, M., Lv, J., Hua, S., ... & He, Y. (2017). Chlorophyll fluorescence imaging uncovers photosynthetic fingerprint of citrus Huanglongbing. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1509.

Chin, E. L., Ramsey, J. S., Mishchuk, D. O., Saha, S., Foster, E., Chavez, J. D., ... & Slupsky, C. M. (2019). Longitudinal transcriptomic, proteomic, and metabolomic analyses of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck graft-inoculated with "*Candidatus Liberibacter asiaticus*". *Journal of Proteome Research*, 19(2), 719-732.

Cho, M. H., Lim, H., Shin, D. H., Jeon, J. S., Bhoo, S. H., Park, Y. I., & Hahn, T. R. (2011). Role of the plastidic glucose translocator in the export of starch degradation products from the chloroplasts in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 190(1), 101-112.

Coletta-Filho, H. D., Carlos, E. F., Alves, K. C. S., Pereira, M. A. R., Boscariol-Camargo, R. L., De Souza, A. A., & Machado, M. A. (2010). In planta multiplication and graft transmission of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' revealed by Real-Time PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 126(1), 53-60.

Coletta-Filho, H. D., Targon, M. L. P. N., Takita, M. A., De Negri, J. D., Pompeu Jr, J., Machado, M. A., ... & Muller, G. W. (2004). First report of the causal agent of Huanglongbing ("*Candidatus Liberibacter asiaticus*") in Brazil. *Plant Disease*, 88(12), 1382-1382.

da Graça, J. V., Douhan, G. W., Halbert, S. E., Keremane, M. L., Lee, R. F., Vidalakis, G., & Zhao, H. (2016). Huanglongbing: An overview of a complex pathosystem ravaging the world's citrus. *Journal of Integrative Plant Biology*, 58(4), 373-387.

Davis, M. J., Mondal, S. N., Chen, H., Rogers, M. E., & Brlansky, R. H. (2008). Co-cultivation of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' with actinobacteria from citrus with huanglongbing. *Plant Disease*, 92(11), 1547-1550.

Docema, M. L. Desafio de laranjeiras doces geneticamente modificadas à infecção por *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. (2020). (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

Etxeberria, E., Gonzalez, P., Achor, D., & Albrigo, G. (2009). Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected Valencia orange trees. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74(1), 76-83.

Fan, J., Chen, C., Achor, D. S., Brlansky, R. H., Li, Z. G., & Gmitter Jr, F. G. (2013). Differential anatomical responses of tolerant and susceptible citrus species to the infection of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 83, 69-74.

Fan, J., Chen, C., Brlansky, R. H., Gmitter Jr, F. G., & Li, Z. G. (2010). Changes in carbohydrate metabolism in *Citrus sinensis* infected with '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. *Plant Pathology*, 59(6), 1037-1043.

Fan, J., Chen, C., Yu, Q., Brlansky, R. H., Li, Z. G., & Gmitter Jr, F. G. (2011). Comparative iTRAQ proteome and transcriptome analyses of sweet orange infected by "*Candidatus Liberibacter asiaticus*". *Physiologia Plantarum*, 143(3), 235-245.

Folimonova, S. Y., & Achor, D. S. (2010). Early events of citrus greening (Huanglongbing) disease development at the ultrastructural level. *Phytopathology*, 100(9), 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. *Phytopathology*, 99(12), 1346-1354.

Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS). Levantamento da incidência das doenças dos citros: greening, cvc e cancro cítrico no cinturão citrícola de São Paulo e triângulo/sudoeste mineiro. (2021). Araraquara, SP: Fundecitrus, 77. Disponível em:

<https://www.fundecitrus.com.br/pdf/levantamentos/Relatorio_levantamento_de_doenças_2021-greening_CVC_e_cancro_citrico.pdf> acesso em: 01 marc. 2022.

Gottwald, T. R. (2010). Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing.

Gottwald, T. R., Sun, X., Riley, T., Graham, J. H., Ferrandino, F., & Taylor, E. L. (2002). Geo-referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida. *Phytopathology*, 92(4), 361-377.

Grosser, J. W., & Gmitter Jr, F. G. (1990). Protoplast fusion and citrus improvement. *Plant Breed Reviews*, 8, 339-374.

Grupo Paulista de Adubação e Calagem para Citros. (1994). Recomendações de adubação e calagem para citros no Estado de São Paulo. Cordeirópolis: Laranja, 27.

Hajiboland, R. (2012). Effect of micronutrient deficiencies on plants stress responses. In *Abiotic stress responses in plants* (pp. 283-329). Springer, New York, NY.

Hermans, C., Bourgis, F., Faucher, M., Strasser, R. J., Delrot, S., & Verbruggen, N. (2005). Magnesium deficiency in sugar beets alters sugar partitioning and phloem loading in young mature leaves. *Planta*, 220(4), 541-549.

Huang, J. H., Xu, J., Ye, X., Luo, T. Y., Ren, L. H., Fan, G. C., ... & Chen, L. S. (2019). Magnesium deficiency affects secondary lignification of the vascular system in *Citrus sinensis* seedlings. *Trees*, 33(1), 171-182.

Hu, B., Rao, M. J., Deng, X., Pandey, S. S., Hendrich, C., Ding, F., ... & Xu, Q. (2021). Molecular signatures between citrus and *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *PLoS Pathogens*, 17(12), e1010071.

Iglesias, D. J., Lliso, I., Tadeo, F. R., & Talon, M. (2002). Regulation of photosynthesis through source: sink imbalance in citrus is mediated by carbohydrate content in leaves. *Physiologia Plantarum*, 116(4), 563-572.

Jang, J. C., & Sheen, J. (1994). Sugar sensing in higher plants. *The Plant Cell*, 6(11), 1665-1679.

Johnson, E. G., Wu, J., Bright, D. B., & Graham, J. H. (2013). Root loss on presymptomatic huanglongbing affected trees is preceded by *Candidatus Liberibacter asiaticus* root infection but not phloem plugging. *Plant Pathol*, 63(2), 290-298.

Keeley, M., Rowland, D., & Vincent, C. (2022). Citrus photosynthesis and morphology acclimate to phloem-affecting huanglongbing disease at the leaf and shoot levels. *Physiologia Plantarum*, 174(2), e13662.

Kim, J. S., Sagaram, U. S., Burns, J. K., Li, J. L., & Wang, N. (2009). Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection: microscopy and microarray analyses. *Phytopathology*, 99(1), 50-57.

Li, J., Li, L., Pang, Z., Kolbasov, V. G., Ehsani, R., Carter, E. W., & Wang, N. (2019). Developing citrus huanglongbing (HLB) management strategies based on the severity of symptoms in HLB-endemic citrus-producing regions. *Phytopathology*, 109(4), 582-592.

Longhi, T. V., de Carvalho, D. U., Duin, I. M., da Cruz, M. A., & Leite Junior, R. P. (2022). Transgenic Sweet Orange Expressing the Sarcotoxin IA Gene Produces High-Quality Fruit and Shows Tolerance to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 9300.

Lopes, S. A., Bertolini, E., Frare, G. F., Martins, E. C., Wulff, N. A., Teixeira, D. C., Fernandes, N. G., Cambra, M. (2009). Graft transmission efficiencies and multiplication of '*Candidatus Liberibacter americanus*' and '*Ca. Liberibacter asiaticus*' in citrus plants. *Phytopathology*, 99(3), 301-6.

Mafra, V., Martins, P. K., Francisco, C. S., Ribeiro-Alves, M., Freitas-Astúa, J., & Machado, M. A. (2013). *Candidatus Liberibacter americanus* induces significant reprogramming of the transcriptome of the susceptible citrus genotype. *BMC Genomics*, 14(1), 1-15.

Ma, W., Pang, Z., Huang, X., Pandey, S. S., Li, J., Xu, J., ... & Wang, N. (2021). Citrus Huanglongbing is an immune-mediated disease that can be treated by mitigating reactive oxygen species triggered cell death of the phloem tissues caused by *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *BioRxiv*.

Ma, W., Pang, Z., Huang, X., Xu, J., Pandey, S. S., Li, J., ... & Wang, N. (2022). Citrus Huanglongbing is a pathogen-triggered immune disease that can be mitigated with antioxidants and gibberellin. *Nature Communications*, 13(1), 1-13.

Murray, M. G., & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(19), 4321-4325.

Nadaletto, M. C. (2016). Transformação genética de laranja doce com gene *glt1* clonado de *Poncirus trifoliata* para tolerância ao huanglongbing (HLB). (Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade de São Paulo).

Nebauer, S. G., Renau-Morata, B., Guardiola, J. L., & Molina, R. V. (2011). Photosynthesis down-regulation precedes carbohydrate accumulation under sink limitation in Citrus. *Tree Physiology*, 31(2), 169-177.

Nicolosi, E., Deng, Z. N., Gentile, A., La Malfa, S., Continella, G., & Tribulato, E. (2000). Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(8), 1155-1166.

Nwugo, C. C., Duan, Y., & Lin, H. (2013a). Study on citrus response to huanglongbing highlights a down-regulation of defense-related proteins in lemon plants upon '*Ca. Liberibacter asiaticus*' infection. *PloS One*, 8(6), e67442.

Nwugo, C. C., Lin, H., Duan, Y., & Civerolo, E. L. (2013b). The effect of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection on the proteomic profiles and nutritional status of pre-symptomatic and symptomatic grapefruit (*Citrus paradisi*) plants. *BMC Plant Biology*, 13(1), 1-24.

Pandey, S. S., Hendrich, C., Andrade, M. O., & Wang, N. (2022). *Candidatus Liberibacter*: From movement, host responses, to symptom development of citrus huanglongbing. *Phytopathology*, 112(1), 55-68.

Pandey, S. S., Nogales da Costa Vasconcelos, F., & Wang, N. (2021). Spatiotemporal dynamics of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' colonization inside citrus plant and huanglongbing disease development. *Phytopathology*, 111(6), 921-928.

Peng, A., Zou, X., He, Y., Chen, S., Liu, X., Zhang, J., ... & Zhao, X. (2021). Overexpressing a NPR1-like gene from *Citrus paradisi* enhanced Huanglongbing resistance in *C. sinensis*. *Plant Cell Reports*, 40(3), 529-541.

Pirone, C. L., Alexander, L. C., & Lamp, W. O. (2005). Patterns of starch accumulation in alfalfa subsequent to potato leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) injury. *Environmental Entomology*, 34(1), 199-204.

Sagaram, M., & Burns, J. K. (2009). Leaf chlorophyll fluorescence parameters and huanglongbing. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134(2), 194-201.

Salazar-Tortosa, D., Castro, J., Villar-Salvador, P., Viñegla, B., Matías, L., Michelsen, A., ... & Querejeta, J. I. (2018). The “isohydric trap”: A proposed feedback between water shortage, stomatal regulation, and nutrient acquisition drives differential growth and survival of European pines under climatic dryness. *Global Change Biology*, 24(9), 4069-4083.

Schaffer, A. A., Liu, K. C., Goldschmidt, E. E., Boyer, C. D., & Goren, R. (1986). Citrus leaf chlorosis induced by sink removal: starch, nitrogen, and chloroplast ultrastructure. *Journal of Plant Physiology*, 124(1-2), 111-121.

Silva, F. C. D. S. (Ed.). (2009). *Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes (Vol. 627)*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Rio de Janeiro: Embrapa Solos.

Song, X., Bhattarai, K., Lv, D., Gao, F., & Ying, X. (2017). Can CRISPR win the battle against Huanglongbing. *Journal Plant Pathol. Microbiol*, 8(2).

Tavano, E. D. R., Vieira, M. L. C., Alves-Mourão Filho, F. D. A., Harakava, R., & Mendes, B. M. J. (2015). Genetic transformation of *Citrus sinensis* 'Hamlin' with attacin A driven by a phloem tissue-specific promoter for resistance to *Candidatus Liberibacter* spp. *Acta Horticulturae*, (1065), 695-701.

Tavanti, T. R., de Melo, A. A. R., Moreira, L. D. K., Sanchez, D. E. J., dos Santos Silva, R., da Silva, R. M., & Dos Reis, A. R. (2021). Micronutrient fertilization enhances ROS scavenging system for alleviation of abiotic stresses in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 160, 386-396.

Texeira, D. D. C., Ayres, J., Kitajima, E. W., Danet, L., Jagoueix-Eveillard, S., Saillard, C., & Bové, J. M. (2005). First report of a huanglongbing-like disease of citrus in São Paulo State, Brazil and association of a new *Liberibacter* species, '*Candidatus Liberibacter americanus*', with the disease. *Plant Disease*, 89(1), 107-107.

Wang, N. (2019). The citrus huanglongbing crisis and potential solutions. *Molecular Plant*, 12(5), 607-609.

Wang, N., Pierson, E. A., Setubal, J. C., Xu, J., Levy, J. G., Zhang, Y., ... & Martins Jr, J. (2017). The *Candidatus Liberibacter*–host interface: insights into pathogenesis mechanisms and disease control. *Annual Review of Phytopathology*, 55, 451-482.

Wang, Z., Yin, Y., Hu, H., Yuan, Q., Peng, G., Xia, Y. (2006). Development and application of molecular-based diagnosis for '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', the causal pathogen of citrus huanglongbing. *Plant Pathology*, 55(5), 630-638.

Weng, H., Liu, Y., Captoline, I., Li, X., Ye, D., & Wu, R. (2021). Citrus Huanglongbing detection based on polyphasic chlorophyll a fluorescence coupled with machine learning and model transfer in two citrus cultivars. *Computers and Electronics in Agriculture*, 187, 106289.

Ye, X., Chen, X. F., Deng, C. L., Yang, L. T., Lai, N. W., Guo, J. X., & Chen, L. S. (2019). Magnesium-deficiency effects on pigments, photosynthesis and photosynthetic electron transport of leaves, and nutrients of leaf blades and veins in *Citrus sinensis* seedlings. *Plants*, 8(10), 389.

Ying, X., Redfern, B., Gmitter, F. G., & Deng, Z. (2020). Heterologous expression of the Constitutive Disease Resistance 2 and 8 genes from *Poncirus trifoliata* restored the hypersensitive response and resistance of *Arabidopsis cdr1* mutant to bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plants*, 9(7), 821.

Yusuf, M. A., Kumar, D., Rajwanshi, R., Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M., & Sarin, N. B. (2010). Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1797(8), 1428-1438.

Zhang, S., Shi, Q., Duan, Y., Hall, D., Gupta, G., & Stover, E. (2018). Regulation of citrus DMR6 via RNA interference and CRISPR/Cas9-mediated gene editing to improve Huanglongbing tolerance. In International Congress of Plant Pathology (ICPP) 2018: Plant Health in A Global Economy. APSNET.

Zhong, Y., Cheng, C., Jiang, B., Jiang, N., Zhang, Y., Hu, M., & Zhong, G. (2016). Digital gene expression analysis of Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) in response to Asia citrus psyllid-vectored Huanglongbing infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1063.

Zou, X., Jiang, X., Xu, L., Lei, T., Peng, A., He, Y., ... & Chen, S. (2017). Transgenic citrus expressing synthesized cecropin B genes in the phloem exhibits decreased susceptibility to Huanglongbing. *Plant Molecular Biology*, 93(4), 341-353.

Zou, X., Zhao, K., Liu, Y., Du, M., Zheng, L., Wang, S., ... & Chen, S. (2021). Overexpression of salicylic acid carboxyl methyltransferase (CsSAMT1) enhances tolerance to huanglongbing disease in Wanjincheng Orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 2803.